

# THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

pour obtenir

le Grade de DOCTEUR ès SCIENCES PHYSIQUES

PAR

**Monsieur Bernard DUPERRAY**

Licencié ès Sciences Physiques

---

PREMIERE THÈSE

**Influence de l'effort musculaire  
sur le métabolisme  
du cholestérol chez le rat**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Soutenues le 4 Mai 1968  
devant la Commission d'Examen**

M. H. PACHECO

Président

Mlle D. GAUTHERON

M. L. CRONENBERGER

} Examineurs



# THÈSES

présentées  
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON  
pour obtenir  
le Grade de DOCTEUR ès SCIENCES PHYSIQUES

PAR

**Monsieur Bernard DUPERRAY**

Licencié ès Sciences Physiques

---

PREMIERE THÈSE

**Influence de l'effort musculaire  
sur le métabolisme  
du cholestérol chez le rat**

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Soutenues le 4 Mai 1968  
devant la Commission d'Examen**

M. H. PACHECO

Président

Mlle D. GAUTHERON

M. L. CRONENBERGER

} Examineurs

THESES



Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, MOUSSA, GAUTHIER Henri

Professeurs honoraires

MM. de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MOUSSA, JAFFARD,  
EYRAUD Henri, DEJARDIN, VIRET, AUMERAS

Doyen

M. BRACONNIER

Assesseurs

MM. L. DAVID  
BOIDIN

Professeurs

|     |                |                                    |
|-----|----------------|------------------------------------|
| MM. | LONGCHAMBON    | Minéralogie                        |
|     | PRETTRE        | Chimie industrielle                |
|     | COURTY         | Chimie-Physique                    |
|     | KUHNER         | Botanique                          |
|     | MALECOT        | Mécanique rationnelle et appliquée |
|     | PARIS          | Chimie minérale                    |
|     | JANIN          | Physique générale                  |
|     | FLANDRIN       | Géologie appliquée                 |
|     | BERNARD        | Physique industrielle              |
|     | NIGON          | Zoologie expérimentale             |
|     | GAUTHIER Henri | Géologie générale                  |
|     | WAUTIER        | Zoologie                           |
|     | CHOPIN         | Chimie biologique                  |
|     | CUEILLERON     | Chimie                             |

|     |                    |                                       |
|-----|--------------------|---------------------------------------|
| MM. | BRACONNIER         | Calcul différentiel et intégral       |
|     | EYRAUD Charles     | Chimie-Physique appliquée             |
|     | SARAZIN            | Physique nucléaire                    |
|     | BOIDIN             | Microbiologie et Mycologie            |
|     | PERES              | Physiologie                           |
|     | MESNARD            | Electronique                          |
|     | GRANDMONTAGNE      | Physique                              |
|     | BOUTILLIER         | Minéralogie                           |
|     | LAFOUCRIERE        | Physique nucléaire théorique          |
|     | DREUX              | Chimie organique                      |
|     | TEICHNER           | Chimie industrielle                   |
|     | PAVANS de CECCATTY | Zoologie                              |
|     | MERLIN             | Chimie analytique                     |
|     | DUFAY Maurice      | Physique de l'atmosphère              |
|     | PHILBERT           | Physique nucléaire                    |
|     | COHEN-ADAD         | Chimie                                |
|     | DAVID Louis        | Géologie (générale)                   |
|     | CHANEL             | Psychophysiologie                     |
|     | MAURY              | Méthodes mathématiques de la physique |
|     | DEPRAZ             | Physique nucléaire                    |
|     | GAUTHIER Jean      | Chimie                                |
|     | GAUME              | Physique expérimentale                |
|     | UZAN               | Physique                              |
|     | LEGAY              | Biologie animale                      |
|     | LAFORGUE           | Physique                              |
|     | GERMAIN            | Chimie                                |
|     | CHENEVOY           | Géologie appliquée                    |
|     | BIGAY              | Astronomie                            |

Professeurs sans chaire

|     |               |                   |
|-----|---------------|-------------------|
| MM. | FERON         | Mathématiques     |
|     | GINET         | Zoologie          |
|     | ASCH          | Physique          |
|     | MICHEL Pierre | Minéralogie       |
| Mle | MAITROT       | Physique          |
| MM. | GEVIN         | Géologie générale |
|     | PONASSE       | Mathématiques     |

|     |                 |                       |
|-----|-----------------|-----------------------|
| MM. | d' INCAN        | Physique C. S. U.     |
|     | LEFEBVRE        | Mathématiques         |
|     | PERNET          | Mathématiques         |
|     | CHERY           | Physique              |
|     | BERGEON         | Physique C. S. U.     |
| Mle | GAUTHERON       | Chimie biologique     |
| MM. | DESCOTES        | Chimie organique      |
|     | ERBEIA          | Physique              |
| Mme | ERICSON         | Physique générale     |
| MM. | LEMOIGNE        | Botanique             |
|     | MARTEL          | Mécanique             |
|     | MATHIEU         | Mécanique des fluides |
|     | MICHEL Georges  | Biochimie             |
|     | PICARD Philippe | Mathématiques         |
|     | LEBRETON        | Biologie végétale     |
|     | TOUSSET         | Chimie propédeutique  |
|     | COMBET          | Mathématiques         |

#### Maîtres de Conférences

|     |            |                               |
|-----|------------|-------------------------------|
| MM. | DEMARCO    | Géologie générale             |
|     | DAVID Jean | Biologie animale              |
|     | FEUVRAIS   | Physique-Electricité          |
|     | SCHMITT    | Physique C. P. E. M.          |
|     | LAURENT    | Chimie organique              |
|     | ROT        | Mathématiques                 |
|     | BETHOUX    | Mathématiques T. M. P.        |
|     | GUSAKOW    | Physique                      |
| Mle | THOMAS     | Chimie minérale               |
| MM. | BUCHWALTER | Mathématiques                 |
|     | BOUZON     | Mathématiques C. S. U.        |
|     | COSNIER    | Psychophysiologie             |
| Mle | LAMOURE    | Biologie végétale             |
| MM. | PORTHAULT  | Chimie C. S. U.               |
|     | VALLET     | Chimie macromoléculaire       |
|     | HAUGAZEAU  | Analyse numérique             |
|     | ENAY       | Géologie                      |
|     | BERTHET    | Biologie végétale C. P. E. M. |
|     | BRUN       | Biologie animale              |
|     | DELMAU     | Physique                      |
|     | EL BAZ     | Physique-Electricité          |
|     | FONTANGES  | Physiologie                   |

|     |               |                       |
|-----|---------------|-----------------------|
| MM. | HUET          | Chimie C. P. E. M.    |
|     | REMOND        | Mathématiques         |
|     | JANIN Pierre  | Mathématiques         |
|     | RUHLA         | Physique              |
|     | DUPUY         | Emission électronique |
|     | CHASTRETTE    | Chimie                |
|     | PARIS Jacques | Chimie                |
|     | DAILLIE       | Biologie animale      |
|     | LARPENT       | Biologie végétale     |
| Mle | WORBE         | Physiologie           |

Maître de Conférences adjoint

|    |         |        |
|----|---------|--------|
| M. | PIERRON | Chimie |
|----|---------|--------|

Conseiller administratif

|    |        |
|----|--------|
| M. | BURNET |
|----|--------|

Secrétaire principal honoraire

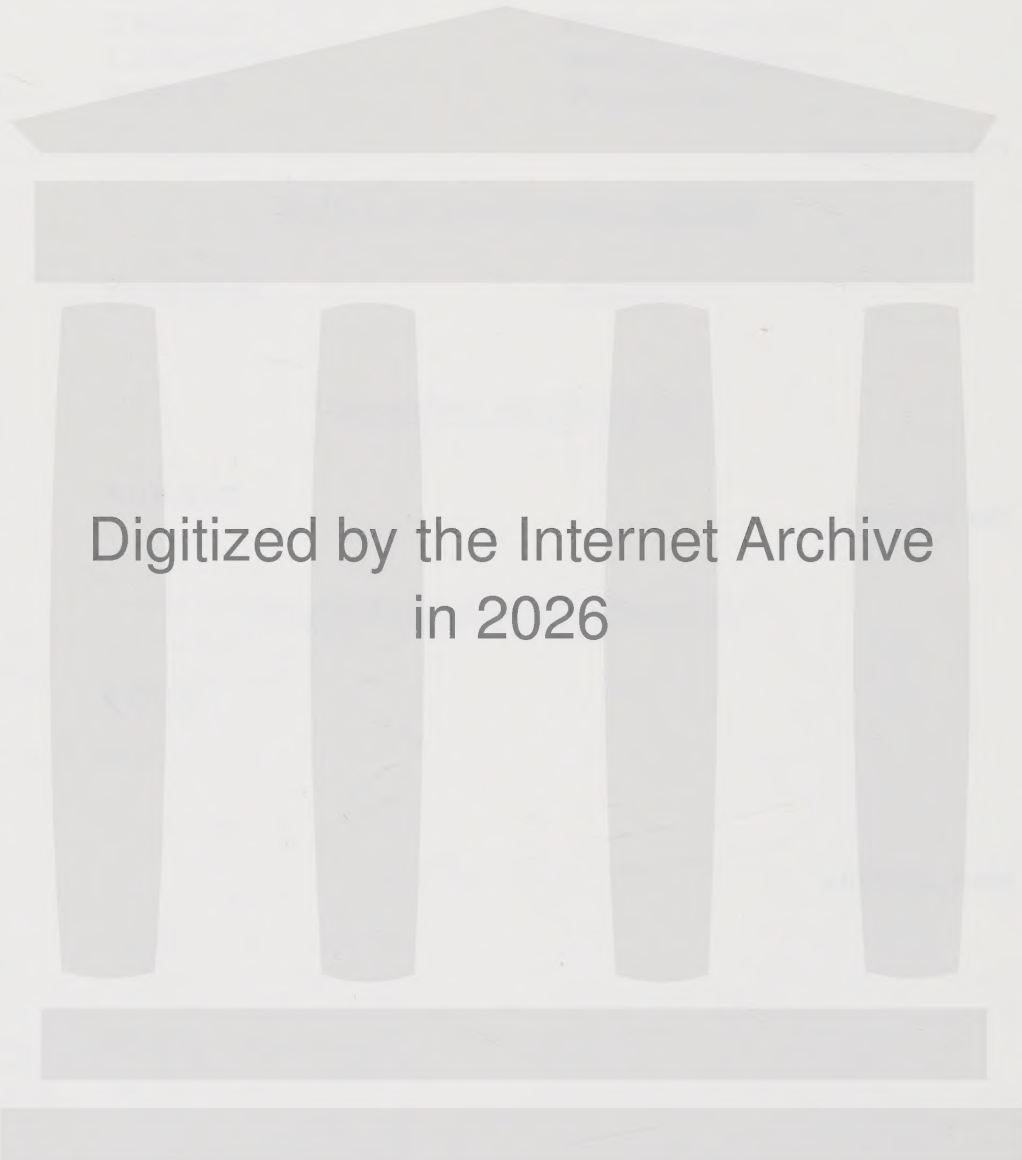
|    |      |
|----|------|
| M. | ROUX |
|----|------|

A tous ceux qui furent mes maîtres

A mes parents

A ma femme

A mes enfants



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552626\\_0016](https://archive.org/details/IA41552626_0016)

## AVANT - PROPOS

---

Ce travail a été réalisé dans le service de Chimie Biologique de l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, sous la direction de Monsieur le Professeur PACHECO à qui je veux dire ma profonde gratitude.

Je remercie Mademoiselle le Professeur GAUTHERON d'avoir bien voulu accepter de faire partie du Jury.

Monsieur CRONENBERGER, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Lyon, m'a souvent aidé de ses conseils et a bien voulu aussi examiner cette thèse : je lui en suis très reconnaissant.

Je remercie également Monsieur VILLE, Maître de Conférences à l'Institut Technique Universitaire de Lyon, à qui je dois mon initiation à la Radiochimie.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Docteur BACQUES qui m'a guidé dans les techniques physiologiques et à tous mes collègues de Laboratoire.



INTRODUCTION

---

GENERALE

---



La Biochimie de l'effort musculaire s'est intéressée, en premier lieu, aux processus métaboliques susceptibles de fournir aux muscles l'énergie qu'ils consomment : de nombreux travaux ont eu pour objet le métabolisme du glucose et des acides gras ou le transport et l'utilisation de l'oxygène. De proche en proche, étendant son domaine, cette recherche s'est appliquée à l'étude des influences exercées par le travail sur le taux des électrolytes sanguins, l'activité d'un grand nombre d'enzymes de divers tissus, la production d'hormones ou le métabolisme des protéines. Cette expansion rapide exigeait une confrontation des résultats et une concertation des recherches.

En répondant à ce besoin, l'organisation, cette année, du premier symposium international sur la Biochimie de l'exercice, permettra à des recherches, jusqu'ici marginales ou mal engagées, de rejoindre un grand courant d'informations et d'idées où elles pourront prendre un nouveau départ. Tel est le cas de la recherche sur les rapports entre l'exercice et le métabolisme du cholestérol : échappant à l'emprise de la Pathologie cardiovasculaire, elle trouvera dans une véritable Biochimie de l'effort, la place qui lui convient et le développement qu'elle mérite. Jusqu'à ces toutes dernières années, en effet, annexée par la recherche sur l'athérosclérose mais, en même temps, négligée par elle au profit du facteur alimentaire, l'étude des relations entre le travail et le métabolisme du cholestérol marquait le pas. Lorsque, il y a six ans, nous avons entrepris les recherches dont nous rendons compte ici, on ne savait à peu près rien de l'influence de l'exercice musculaire sur le métabolisme du cholestérol.

Quelques enquêtes, effectuées sur de larges échantillons de population, semblaient montrer une cholestérolémie plus faible chez les groupes socio-économiques physiquement actifs que chez les groupes sédentaires (1 à 3). Un nombre restreint d'expériences effectuées sur l'homme ou l'animal, indiquaient une relation semblable (4-5) ou, au contraire, l'absence de relation, entre la cholestérolémie et l'exercice (6 à 12). D'autres expériences révélaient que le travail exerçait sur la cholestérolémie une influence dont le sens et l'importance variaient selon le sexe, le niveau d'entraînement, le type et la durée de l'exercice ou le taux initial de la cholestérolémie (13 à 17)

Ne retenant que le critère de la cholestérolémie,

l'étude des rapports entre le travail et le métabolisme du cholestérol semblait ne pas pouvoir progresser. L'adoption de nouveaux critères s'imposait. Les extraordinaires progrès de la biochimie du cholestérol, depuis 1950 (18), permettaient d'en trouver : la biosynthèse hépatique du cholestérol, ou sa conversion en hormones corticosurrénales, en hormones sexuelles ou en acides biliaires.

Nous avons donc entrepris de mettre à l'épreuve de ces nouveaux critères l'hypothèse que nous formulions : l'accroissement de la consommation d'énergie entraîné par le travail musculaire devrait conduire à une diminution de l'énergie disponible pour la biosynthèse du cholestérol et à un ralentissement de celle-ci.

Nous fondions cette hypothèse sur les remarques suivantes : d'une part, les muscles, pour fournir un travail, exigent la consommation d'importantes quantités d'énergie sous forme d'ATP que l'organisme trouve dans la dégradation des acides gras mais également dans celle du glycogène par la voie d'EMBDEN-MEYERHOFF et le cycle de KREBS ; l'oxydation du NADPH peut contribuer aussi à la production d'ATP (19). D'autre part, la synthèse du cholestérol (figure 1) (20 à 22) consomme du NADPH qui semble fourni par la voie "shunt" des hexoses-monophosphates partiellement concurrente de la glycolyse de la voie EMBDEN-MEYERHOFF (23).

Notre travail a consisté, en premier lieu, en une prospection des sites où nous pourrions contrôler le plus facilement l'influence de l'exercice sur le métabolisme du cholestérol et des conditions expérimentales les plus convenables à notre étude. Nous avons tenté de déterminer les effets de l'exercice sur le poids du foie, des glandes surrénales et des testicules, sur le taux de cholestérol hépatique et sérique, sur la masse totale de cholestérol hépatique et sur le taux d'estérification du cholestérol sérique. Ces mesures devaient préparer les étapes suivantes en permettant le choix des directions de recherche les plus prometteuses et en fournissant les bilans nécessaires à l'interprétation des résultats à venir.

Les conclusions que nous avons tirées de cette première partie de nos travaux et les nouvelles hypothèses que nous avons alors formulées, nous ont conduit, en un second temps, à mesurer l'activité cholestérogénique du foie en déterminant la vitesse d'incorporation "in vitro" du  $^{14}\text{C}$  de l'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$  dans le cholestérol, par des tranches de foie.

En une tentative de localisation des effets de l'exercice observés sur la cholestérogénèse hépatique, nous avons également essayé de déterminer l'influence de l'effort musculaire sur l'activité de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase hépatique, productrice de NADPH dans le cycle des pentoses.

La troisième partie de notre recherche a trouvé son orientation dans l'interprétation des résultats précédemment acquis : une mesure de la conversion du cholestérol en acides biliaires s'avérerait nécessaire pour un meilleur contrôle des modifications apportées par l'exercice au métabolisme du cholestérol. Nous avons d'abord mesuré les volumes de bile débités en deux heures, juste après la mise en place d'un catheter sur le canal cholédoque, ainsi que la masse et la distribution pondérale de divers acides biliaires et du cholestérol dans cette bile. L'interprétation délicate des résultats obtenus nous a conduits à chercher une information complémentaire dans la mesure des vitesses de formation des acides Cholique et Chénodésoxycholique.

Pendant que nous poursuivions ces recherches, quelques autres chercheurs en effectuaient de semblables. En effet, depuis 1961, outre une dizaine de publications qui n'ont pas apporté d'acquisition vraiment nouvelle (24 à 34), ont paru sept études de l'influence du travail sur le métabolisme hépatique du cholestérol (35 à 38) ou sur le poids ou le taux de cholestérol de divers tissus (39 à 41). Les modalités et les résultats de ces études, contemporaines de nos propres publications (42 à 44), seront exposés lorsque nous discuterons les résultats que nous avons nous-mêmes obtenus.

Nous présenterons nos travaux de la manière suivante :

CHAPITRE PREMIER - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE POIDS  
DU FOIE, DES GLANDES SURRENALES ET  
DES TESTICULES, SUR LA CHOLESTERO-  
LEMIE ET SUR LE TAUX ET LA MASSE  
TOTALE DE CHOLESTEROL HEPATIQUE.

- Introduction
- Matériel biologique et Techniques
- Résultats
- Discussion des résultats, révision de l'hypothèse de départ.

CHAPITRE SECOND - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR L'INCOR-  
PORATION "IN VITRO" DE L'ACETATE DE  
SODIUM - 1 - <sup>14</sup> C DANS LE CHOLESTEROL  
PAR DES TRANCHES DE FOIE ET SUR LA  
PRODUCTION "IN VITRO" DE NADPH PAR  
UNE FRACTION D'HOMOGENAT DE FOIE.

- Introduction
- Techniques
- Résultats
- Discussion des résultats

CHAPITRE TROISIEME - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LA RE-  
PARTITION PONDERALE DU CHOLESTE-  
ROL ET DE PLUSIEURS ACIDES BILIAIRES  
DANS LA BILE.

- Introduction
- Techniques
- Résultats
- Discussion des résultats

CHAPITRE QUATRIEME - DISCUSSION ET INTERPRETATION  
GENERALES.

CONCLUSIONS.

Figure 1 A - Schéma simplifié des principales étapes de la biosynthèse du cholestérol

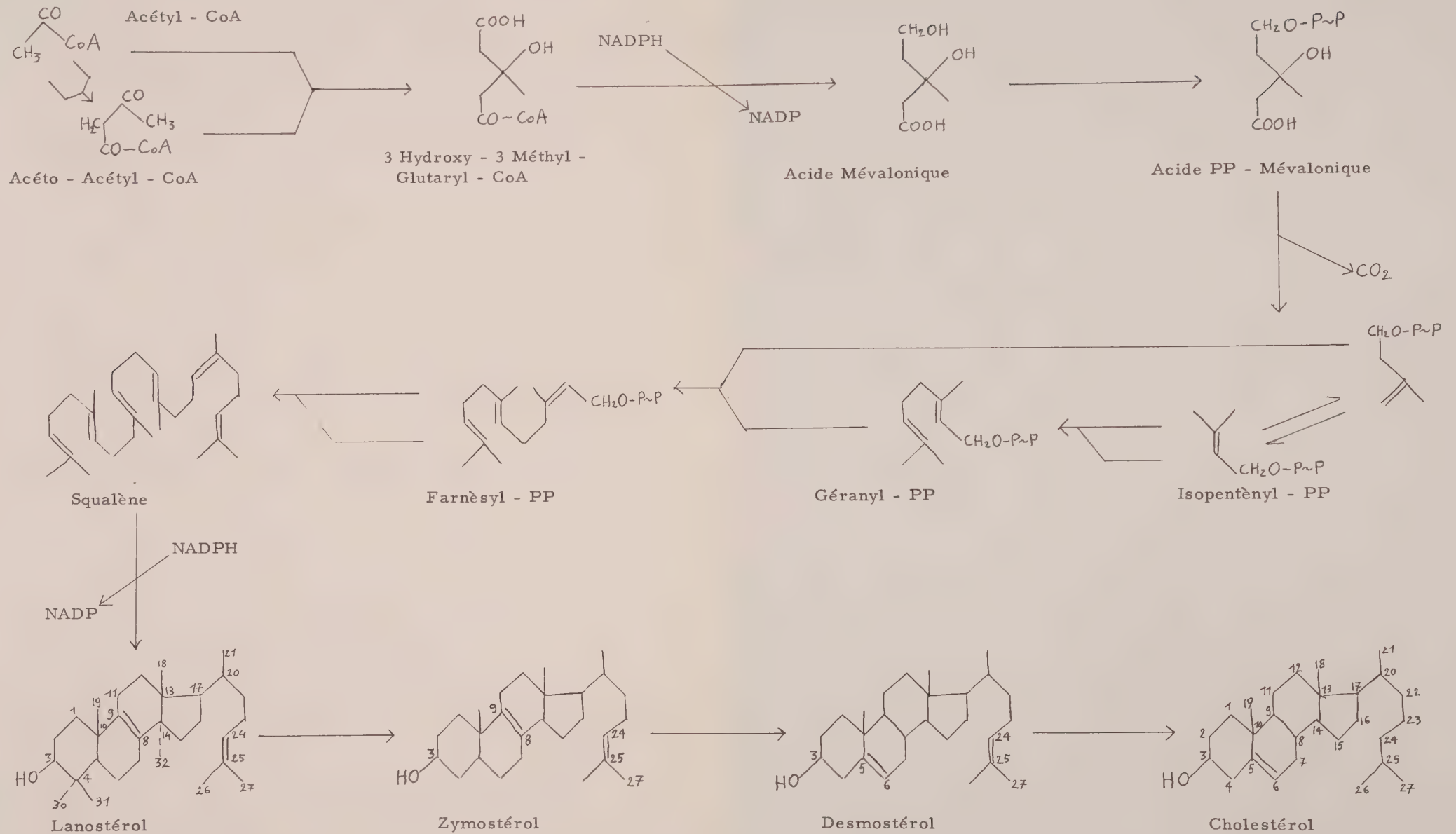
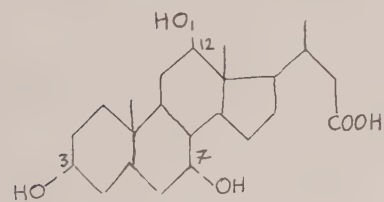
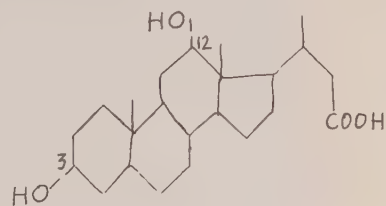


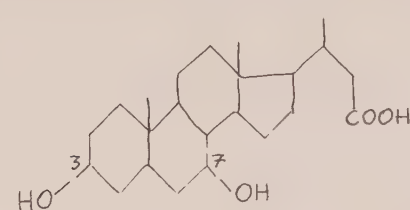
Figure 1 B - Formules développées des principaux acides biliaires du rat. Les substituants placés au-dessus du plan du cycle sont dits  $\beta$   
Placés au-dessous, ils sont dits  $\alpha$  (trait discontinu)



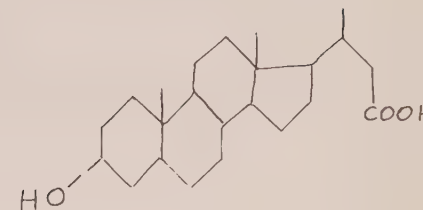
Acide Cholique



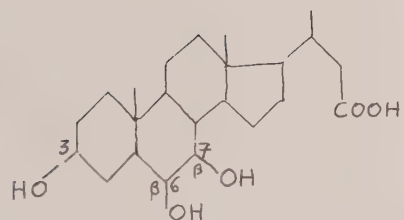
Acide Désoxycholique



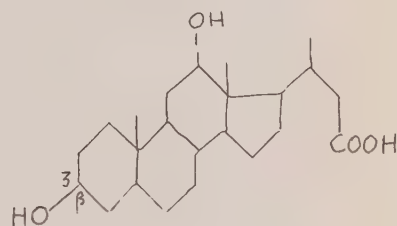
Acide Chénodésoxycholique



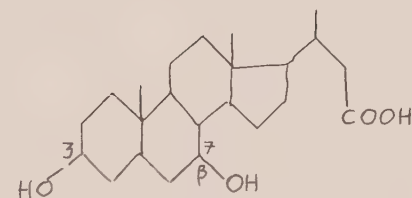
Acide Lithocolique



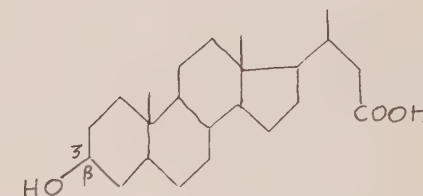
Acide  $\beta$  Muricholique



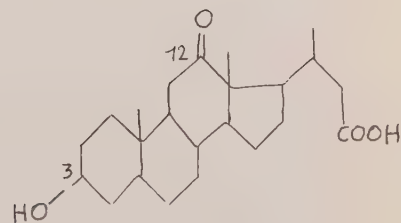
Acide Epidésoxycholique



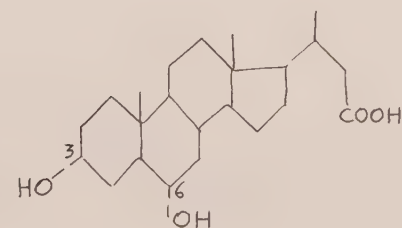
Acide Ursodésoxycholique



Acide Epilithocolique

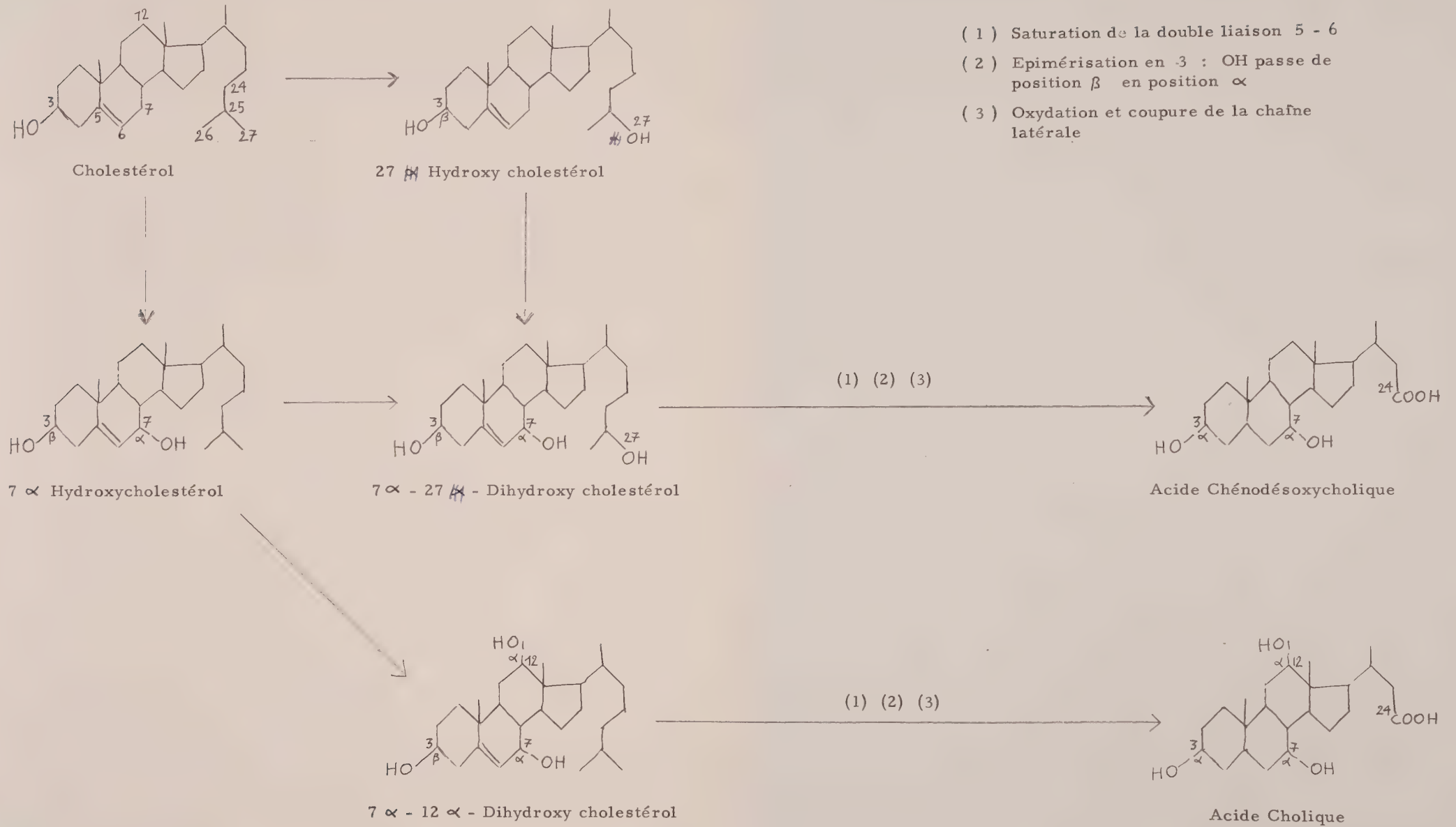


Acide Cétolithocolique



Acide Hyodésoxycholique

Figure 1 C - Schéma simplifié de la conversion du cholestérol en acides biliaires chez le rat





CHAPITRE PREMIER

INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE POIDS DU FOIE, DES GLANDES  
SURRENALES ET DES TESTICULES, SUR LA CHOLESTEROLEMIE  
ET SUR LE TAUX ET LA MASSE TOTALE DE CHOLESTEROL HEPATIQUE.



1 -

## I N T R O D U C T I O N

Le défaut d'informations sur les voies offertes à notre recherche nous a engagés à commencer notre travail en prospectant dans plusieurs directions : nous avons ainsi pesé les glandes surrénales et les testicules dont une variation de poids pouvait indirectement indiquer une modification dans l'activité de conversion du cholestérol en hormones. Nous avons surtout étudié le foie, centre important de formation et de dégradation du cholestérol, en mesurant son taux et sa réserve totale de cholestérol (par conséquent, également son poids). Le fait que d'étroites relations existent entre le cholestérol sérique et le cholestérol hépatique, nous a entraînés à chercher un éventuel complément d'information dans l'étude du cholestérol sérique dont nous avons déterminé le taux global et le degré d'estérification.

Nous cherchions des signes d'une éventuelle influence de l'exercice sur le métabolisme du cholestérol : seraient-ils perceptibles juste après l'effort ou seulement à la suite d'un entraînement prolongé ? Ne seraient-ils pas plus nets chez un individu hypercholestérolémique que chez un individu normal ? En prévoyant ces diverses possibilités dans l'organisation de notre travail, nous donnions à notre prospection, de meilleures chances d'être fructueuse. Nous avons donc mis au point une expérimentation permettant d'observer les effets du travail, aussi bien immédiatement au sortir de l'exercice qu'après un repos de 24 h., et chez des individus recevant un régime alimentaire hypercholestérolémiant aussi bien que sur des individus normalement nourris.

2 -

MATERIEL BIOLOGIQUE ET TECHNIQUES

2.1 - MATERIEL BIOLOGIQUE

2.1.1. - Conditions d'élevage

Nous avons utilisé des rats blancs de souche WISTAR. Les motifs du choix de cette espèce et de cette souche sont de différents ordres : abondance des données scientifiques sur la physiologie du rat, considération du prix d'achat et d'entretien, commodité de l'élevage, simplicité du matériel d'exercice, robustesse et docilité de l'animal.

Nous avons placé les animaux, par groupes de 8 à 10, en séparant les rats exercés des rats non exercés, dans des cages métalliques aérées conçues pour rendre impossible l'accès aux excréments. Toutes les cages ont la même orientation et sont disposées très près les unes des autres, à la même hauteur, de telle sorte que la température et l'éclairement soient identiques pour toutes. La température, dans la salle d'élevage, est maintenue constante à 22° C par une arrivée d'air chaud et un départ d'air vicié réglée par un thermostat.

2.1.2. - Poids des animaux

Pour les expériences décrites dans ce premier chapitre, nous avons pris des rats de 80 - 100 g au début de l'expérience et de 200 g à la fin (âge d'environ trois mois). Il est apparu que la plus faible croissance des animaux exercés leur permettait difficilement d'atteindre ce poids final en cinq ou six semaines d'expérimentation.

Par ailleurs, les expériences qui suivirent demandaient, pour faciliter les contrôles ou les techniques proprement physiologiques, des rats plus gros. Nous avons donc, pour ces expériences (chapitres deux et trois), pris des animaux de 100-120g dont le poids final fut, en moyenne, de 290 g pour les rats témoins et 250 g pour les rats exercés.

Enfin, nous avons utilisé des rats d'un poids final de 350g pour deux expérience de caractère accessoire, la première fois (série 1), à un moment où nous cherchions encore la forme de notre expérimentation, la seconde fois (série 16, page 107), parce que le poids élevé de l'animal, de peu d'importance dans l'interprétation des résultats cherchés, laissait espérer, avec des volumes de bile plus importants, des mesures plus faciles et plus précises.

### 2. 1. 3 - Sacrifice. Prélèvement des tissus.

Les rats ont été sacrifiés par décapitation. Lorsque le sang devait être recueilli, il l'a été directement dans des tubes à centrifuger. Le foie, les glandes surrénales, les testicules, ont été prélevés immédiatement après le sacrifice.

### 2. 1. 4. - Régime alimentaire

Nous avons employé deux régimes alimentaires différents, distribués "ad libitum". Le premier est constitué de biscuits M-25 des Ets PIETREMENT (Ste Colombe, S. et M.); cet aliment vitaminé complet, comporte, en poids, 8% de matières minérales, 6,5% de matières grasses et 25,4% de matières azotées. Nous y avons trouvé un taux de substances colorables par la réaction de LIEBERMANN, de 0,07%. Ce régime a été celui de plusieurs expériences (séries 5, 6, 7) décrites dans ce premier chapitre et de toutes celles que nous décrivons dans les chapitres 2 et 3 (séries 8 à 16).

Le second régime, tenu pour hypercholestérolémiant, consiste en un mélange homogène de quatre parties d'une farine de même composition que les biscuits et d'une partie de saindoux. Nous avons trouvé dans le saindoux à peu près le même taux (0,09%) de substances colorables par la réaction de LIEBERMANN que dans les biscuits. Le mélange est présenté en boulettes agglomérées avec le minimum d'eau; les restes de ces boulettes sont retirés des cages dans les deux jours. Nous avons utilisé ce régime pour certaines des expériences exposées dans le premier chapitre (séries 2 à 4).

Une seule série d'animaux (série 1), destinée à la comparaison des deux régimes, comporte, simultanément, des rats recevant le premier régime et des rats recevant le second.

Quel que soit le régime alimentaire proposé aux animaux, tous ont été sacrifiés après un jeûne de 24 h., sauf ceux de la dernière expérience (série 16). Nous avons opéré de cette façon pour éviter les interférences des variations pré- ou post-prandiales des taux de cholestérol sérique ou d'acides biliaires dans la bile (45) ; l'inconvénient du jeûne est qu'il semble ralentir le métabolisme du cholestérol dans le foie (46 - 47).

#### 2.1.5. - Exercice

##### 2.1.5.1. - Premier type de travail imposé aux rats : la nage.

Motifs de l'abandon de ce mode d'exercice.

Le travail imposé aux animaux exercés a d'abord été la nage dans un bain à 37° C. La mise en oeuvre de ce type d'exercice paraissait très simple et peu onéreuse. Mais il nous a rapidement paru inadéquat pour diverses raisons.

D'abord, lorsque la durée de l'exercice dépassait 20 mn., les rats sortaient affolés du bain, bondissant et poursuivant dans le vide les mouvements de la natation. Cet affolement introduisait dans l'expérience un premier facteur étranger à l'exercice, dont l'influence sur le métabolisme du cholestérol pouvait ne pas être nulle. Effectivement, plusieurs travaux ont montré que, chez le rat (48) ou l'homme (49 à 52), l'émotion, l'appréhension ou la peur, pouvaient provoquer des modifications dans le stock hépatique de cholestérol estérifié et dans la concentration sérique de cholestérol ou d'hormones corticostéroïdes. Il n'est pas certain que faire nager les rats plusieurs fois par jour pour de courtes durées, puisse éliminer complètement ce facteur parasite ; de plus, cette pratique complique considérablement la mise en oeuvre de l'exercice.

Ensuite, nous pensions que l'immersion elle-même, qui augmente considérablement les pertes d'énergie par conduction, introduisait un second facteur étranger. Depuis, on a montré que des rats obligés de rester dans l'eau sans nager, aussi longtemps que des rats obligés de nager, présentaient les mêmes valeurs que ces derniers en ce qui regarde le cholestérol et les liquides hépatiques (53).

Il est donc nécessaire de mettre dans l'eau les témoins non exercés aussi souvent et aussi longtemps que les rats exercés.

Enfin, il nous paraissait difficile de remettre les rats dans leur cage, au sortir du bain, sans les sécher. Nous sècheons les rats dans un sèche-ventilé à 37°C : cette opération s'est révélée très éprouvante pour les animaux. Des rats, séchés 60 mn, ont eu un taux de croissance de 2,2 g/jour puis, séchés 25 mn, de 3,5 g/jour alors que, normalement, le taux de croissance tend à diminuer avec l'âge. Une série entière de rats a été perdue pour avoir été oubliée une nuit dans le sèche-ventil.

La solution de ces différents problèmes compliquait fortement la pratique de la nage. Nous l'avons donc abandonnée. Malgré le nombre important d'animaux que nous avons entraînés à la nage, nous n'avons rien retenu de ces séries dans les résultats que nous présentons. La place qu'occupe ce type d'exercice dans les expériences décrites dans la littérature exigeait cependant que nous en parlions : on comprendra ainsi plus aisément la prudence avec laquelle nous comparerons nos résultats à ceux que d'autres chercheurs ont obtenus en faisant nager leurs animaux d'expérience.

#### 2.1.5.2. - Mode d'exercice retenu : la marche.

Nous avons remplacé la nage par la marche dans un large cylindre de plexiglass aéré, divisé en huit compartiments et tournant autour d'un axe horizontal. L'entraînement est assuré par un moteur électrique couplé avec un variateur de vitesse.

Ce changement d'exercice écartait les inconvénients que nous avons trouvés à la nage mais comportait le risque, qu'il nous a fallu éviter, de nouveaux facteurs parasites : le bruit pendant l'exercice et l'accès aux excréments à la suite de l'exercice. En effet, d'une part, le bruit émis par l'appareil de marche aurait pu fausser les expériences (hyperfonctionnement thyroïdien provoqué par le bruit)(54) si nous n'avions pas placé les cages suffisamment près de l'appareil pour que tous les rats, exercés ou non, soient soumis au même niveau sonore pendant toute la durée de fonctionnement de l'appareil. D'autre part, pour éviter la consommation d'excréments par les seuls exercés, il a fallu nettoyer et sécher l'intérieur de l'appareil chaque fois qu'un rat en a remplacé un autre dans un compartiment : en cas de nettoyage défectueux, le rat sort de l'exercice souillé d'excréments qu'il lèche dès son retour dans la cage.

Nous avons ainsi obtenu des conditions égales pour tous les groupes entre lesquels nous avons répartis les rats de chaque expérience. Une série normale de rats comporte, en effet, deux groupes d'animaux :

- groupe T : animaux témoins ne travaillant pas.
- groupe E : animaux soumis quotidiennement, pendant deux ou trois semaines, à un entraînement progressif à la marche, puis, pendant trois semaines, à une marche de 1 h. par jour (distance parcourue : 1400 m). Les animaux E sont divisés, au moment de leur utilisation, en deux sous-groupes A et B :
  - les animaux A sont utilisés 24 h. après leur dernière marche
  - les animaux B doivent marcher 2 h. (2800 m), immédiatement avant leur utilisation

Les résultats obtenus avec une série normale de répartissent donc en trois colonnes : témoins T, exercés au repos A, exercés, après exercice B.

Deux séries ne comportent pas de rats A ou B mais seulement un groupe de rats T et un groupe T' (rats non exercés, obligés de travailler une seule fois, juste avant le sacrifice, 2 h., 1900 m).

Enfin, deux séries ne comportent que des rats T non exercés : la série 1 et la série 16.

-----

## 2.2. - TECHNIQUES

### 2.2.1. - Pesées

Toutes les pesées d'organes ou de fractions d'organes ont été effectuées sur une balance Mettler donnant le 1/20e de mg, immédiatement après le prélèvement sur l'animal décapité. Les animaux vivants ont été pesés sur une balance automatique donnant le gramme.

### 2.2.2. - Technique d'extraction du cholestérol hépatique.

Pour extraire le cholestérol du foie, nous avons utilisé la méthode de ZWINGELSTEIN (55) :

le foie fraîchement prélevé est pesé, broyé dans un mortier avec du sable fin, placé dans un ballon rodé de 500 ml avec 60 ml de potasse hydro-alcoolique (25g pour 300 ml du mélange eau (★)-alcool 50/50 vol.) et placé au bain-marie à 100°C. Dans certains cas, les foies ont été lyophilisés pour permettre leur stockage avant l'extraction du cholestérol. Le foie est réduit en une fine bouillie, à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax, dans un bécher maintenu entre -10°C et -20°C dans un mélange congelé d'eau et d'alcool. La bouillie est versée dans un tube à lyophiliser taré. Après pesée, le tube est fermé au liège et conservé à -20°C. Dans les 48 h. qui suivent, il est branché sur un lyophilisateur Usifroid. La perte de poids, toujours nulle après 15 h., est très régulière : 66 foies lyophilisés ont été desséchés à 70,2% avec un écart type de 1,5; et les deux parties d'un même foie ont été desséchées, l'une à 69,8%, l'autre à 70,0%. Le tube reste 20 h. sur l'appareil. Il est alors retiré et fermé au liège; il reçoit, sur le goulot et le bouchon, une épaisse couche de colle plastique assurant l'étanchéité. Le foie lyophilisé est conservé à la chambre froide à 4°C. Au moment de l'extraction, la poudre de foie est versée dans le ballon de 500 ml et le tube qui la contenait est rincé avec la potasse utilisée pour la saponification.

On laisse la potasse hydroalcoolique digérer le foie pendant une heure d'ébullition à reflux. Le ballon est alors retiré du bain-marie et refroidi. Son contenu, additionné d'eau, est placé dans une ampoule à décantation avec l'eau et l'éther (★) qui servent à rincer le ballon (au total, 120 ml d'eau et 100 ml d'éther). On procède à trois extractions du cholestérol par l'éther (100 ml chaque fois). Les trois phases éthérées réunies dans l'ampoule, sont lavées avec de petites quantités d'eau jusqu'à neutralité (en pratique, trois fois). Elles sont ensuite recueillies dans un erlen de 500 ml où l'on verse également les 50 ml d'éther qui servent, en trois fois, à rincer l'ampoule. On conserve cette solution éthérée de cholestérol, bouchée, à l'abri de la lumière, sur du sulfate de soude sec, pendant au moins 15 h.

---

(★) Nous utilisons, en général, de l'eau déminéralisée. Pour les incubations de tissus et les mesures d'activité enzymatique, nous employons de l'eau déminéralisée distillée dans du verre. L'éther est débarrassé extemporanément des peroxydes par reflux et distillation sur sulfate ferreux.

Elle est alors filtrée sur coton de verre et placée dans un ballon de 1 litre qui reçoit aussi l'éther (3 fois 20 ml) de rinçage de l'erien. Le ballon est porté au bain-marie à 40° C - 50° C pour évaporation de l'éther ; l'opération est terminée sous pression réduite hors du bain-marie. Le résidu, dissous dans le chloroforme, est reçu dans une fiole jaugée de 10 ml que l'on tient fermée, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment du dosage.

#### 2.2.3. - Technique d'extraction du cholestérol sérique total.

La méthode de BLOOR (56) modifiée par BOYD nous a servi à pratiquer l'extraction du cholestérol sérique total. Le sang du rat, coagulé, est centrifugé 2 h. après le sacrifice, pendant 5 mn, à 4.000 t/mn. Il ne présente aucune trace d'hémolyse (au moment du sacrifice, le sang est recueilli directement dans le tube à centrifuger, précisément pour éviter toute hémolyse ultérieure). Le serum est conservé en tube fermé à 4° C. Il est utilisé dans les 48 h. Dans un erlen de 50 ml contenant 20 ml d'un mélange alcool 95° - éther (75/25 vol.), on verse goutte à goutte 1 ml de serum. On disperse le précipité de protéines par agitation. On laisse reposer 1 h.30 puis on filtre sur coton de verre ; on évapore le solvant au bain-marie à 100 ° C ; le résidu sec est dissous dans le chloroforme bouillant, filtré sur papier et reçu dans une fiole jaugée de 10 ml qui est conservée, fermée, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment du dosage.

Pour les besoins des contrôles de validité décrits plus loin, d'autres techniques ont été utilisées : la technique de BLOOR non modifiée (au lieu de laisser reposer la solution alcoolique, on la porte à ébullition et on filtre à chaud), la technique de KRIEGER (58) où les protéines sont précipitées à l'alcool sodé et le cholestérol extrait par l'éther dans une ampoule à décantation, enfin la technique d'ASSOUS et GIRARD (59) qui ne comporte aucune extraction mais une réaction colorimétrique directement sur le serum.

#### 2.2.4. - Technique d'extraction du cholestérol sérique estérifié.

Pour que le cholestérol estérifié soit extrait selon une technique aussi proche que possible de la technique utilisée pour l'extraction du cholestérol total, nous avons suivi la méthode de BLOOR et KNUDSON (60)

Après la précipitation des protéines par le mélange alcool-éther et leur élimination par filtration, on précipite le cholestérol libre par 2,5 ml de Digitonine à 0,5% dans l'alcool; on laisse ensuite reposer à l'abri de la lumière pendant 24 h. Le solvant est évaporé au bain-marie à 100°C; le résidu sec est repris par de l'éther de pétrole qu'on filtre sur papier et qu'on évapore au bain-marie à 100°C; le résidu est dissous dans du chloroforme que l'on recueille dans une fiole jaugée de 10 ml conservée, fermée, à l'abri de la lumière, jusqu'au moment du dosage.

## 2.2.5 - Technique de dosage du cholestérol.

Le cholestérol en solution chloroformique a été dosé selon la méthode de MACHEBOEUF et DELSAL (61) qui fait appel à la réaction colorée de LIEBERMANN (62) et BURCHARD (63). Dans un tube à essai, on introduit, selon les expériences, de 0,2 ml à 5,0 ml de la solution, la quantité de chloroforme nécessaire pour amener le volume à 5,0 ml et 2 ml d'anhydride acétique pur. On agite le tube puis on y introduit 5 gouttes d'acide sulfurique pur ( $D = 1,83$ ). On agite rapidement le tube et on le place dans un bain thermostaté à 37°C. Exactement 10 mn après l'introduction de l'acide sulfurique, on mesure l'extinction à environ 650 m $\mu$  dans un photolorimètre Meunier (écran 67). Le résultat de la lecture est interprété sur le graphique d'étalonnage. Celui-ci est obtenu à partir d'une solution chloroformique préparée extemporanément avec du cholestérol "pur" (Prolabo) purifié par une double recristallisation dans le Méthanol. Cet étalonnage est effectué le jour même du dosage, juste avant ou juste après celui-ci, avec des réactifs provenant des mêmes flacons.

Un certain nombre de stérols donnent la réaction de LIEBERMANN. Lorsque le rat n'a pas été traité par un inhibiteur des dernières étapes de la cholestérogénèse, son foie ne contient guère que des traces de ces stérols parasites et l'on peut négliger leur intervention. Les esters naturels de cholestéryle réagissent exactement comme le cholestérol libre (64). Le développement ultérieur de nos recherches vers l'analyse de la bile nous a conduits à vérifier que les acides Cholique, Désoxycholique, Chénodésoxycholique, Hyodésoxycholique et Lithocholique n'interfèrent pas dans le dosage. Pour ce contrôle, nous avons placé l'acide biliaire sec dans le tube, versé ensuite l'anhydride acétique qui dissout l'acide, puis le chloroforme.

Si l'on inverse cet ordre, la dissolution de l'acide est très défectueuse. Ce défaut de solubilité des acides biliaires dans le chloroforme a d'ailleurs l'avantage d'éliminer presque totalement la possibilité de leur présence dans la solution de cholestérol.

2.2.6. - Contrôle de validité des techniques d'extraction et de dosage du cholestérol hépatique.

Dans le but de contrôler la reproductibilité des mesures de cholestérol hépatique, nous avons pris des foies divisés en deux parts que nous avons traitées séparément. Les taux de cholestérol hépatique obtenus avec quatre foies frais et un foie lyophilisé ont été les suivants :

| foie frais                                                | foie lyophilisé                                         |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| taux de cholestérol hépatique<br>mg cholest./g foie frais | Taux de cholestérol hépatique<br>mg cholest./g foie sec |
| 1 - 0,3025 $\pm$ 0,0065                                   | 5 - 0,695 $\pm$ 0,005                                   |
| 2 - 0,240 $\pm$ 0,007                                     |                                                         |
| 3 - 0,2925 $\pm$ 0,0005                                   |                                                         |
| 4 - 0,167 $\pm$ 0,001                                     |                                                         |

Pour chaque contrôle, on donne la moyenne des deux valeurs obtenues et l'écart entre ces valeurs et la moyenne. Ces contrôles ont été effectués avec des rats provenant de deux lots différents : contrôles 1, 2, 3 en été, - contrôles 4 et 5, à l'automne.

De 0,595 mg de cholestérol ajouté, en cinq contrôles parallèles, à la solution potassique hydroalcoolique, on a retrouvé, au dosage, 0,503  $\pm$  0,011 mg.

Le rendement de la technique d'extraction est donc assez peu satisfaisant (85 %) mais régulier et reproductible à moins de 3 % près. Cette dernière incertitude inclut celle des opérations de dosage qui est de 5  $\mu$ g sur une prise de 500  $\mu$ g environ, soit 1 %. Les pertes de cholestérol sont dues principalement à la présence d'alcool dans la solution potassique de foie lors de l'extraction à l'éther ; l'alcool, bon solvant du cholestérol, se partage entre l'éther et la phase aqueuse. Un autre facteur de pertes est le séchage de la solution étherée sur sulfate de soude.

## 2.2.7 - Contrôle de validité des techniques d'extraction et de dosage du cholestérol sérique.

La reproductibilité des mesures de cholestérol sérique total est semblable à celle des mesures de cholestérol hépatique. Vingt prises de un ml de sérum de bovin, traitées selon la technique de BLOOR modifiée par BOYD ont donné le même résultat à 2,3% près.

Trente prises de un ml du même sérum ont été traitées selon la méthode de KRIEGER (10 prises) ou de BLOOR (10 prises) ou en prolongeant 24 h. (au lieu de 1 h. 30) l'extraction du cholestérol par le mélange alcool-éther (10 prises). Nous avons constaté que le rendement de la méthode BLOOR-BOYD était exactement le même que celui de la méthode KRIEGER et à peine supérieur (2%) à celui de la méthode BLOOR. Le prolongement de la durée de l'extraction pendant 24 h. diminue la reproductibilité et le rendement : là se trouve peut être l'explication de l'imprécision dans la détermination du cholestérol estérifié. En effet, pour obtenir la précipitation du cholestérol libre, on laisse reposer 24 h. le mélange de sérum, d'alcool-éther et de digitonine. Il est possible, également, que la précipitation ne soit pas toujours totale. Dix prises de un ml de sérum ont été traitées parallèlement : les résultats individuels trouvés variaient de 9,5% et de 12,5% autour de la moyenne, respectivement pour le taux de cholestérol estérifié et pour le degré d'estérification (rapport estérifié/total).

Nous avons testé la méthode ASSOUS-GIRARD qui applique directement au sérum une détermination différentielle du cholestérol libre et du cholestérol total, en utilisant la réaction colorée de ZLATKIS, ZAK et BOYLE (65). De très nombreux essais, effectués sur du sérum de chèvre, ne nous ont pas permis de trouver à cette méthode un rendement et une reproductibilité ou une commodité supérieure à ceux des techniques utilisées dans nos expériences. Elle est cependant plus rapide et exige une plus faible quantité de sérum; mais nous en avons eu connaissance trop tardivement pour pouvoir nous en servir.

## 2.2.8. - Traitement statistique des résultats (66 - 67)

Nous présenterons, pour chaque groupe de plus de cinq rats, la moyenne arithmétique ( $m$ ) des valeurs individuelles accompagnées de l'indication de l'écart maximal probable ( $\pm e$ ) pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ). Si l'on désigne la variance par ( $\sigma^2$ ), le nombre de mesures individuelles par ( $n$ ),

$$e = \tau \sqrt{\frac{\sigma^2}{n}}$$

( $\tau$ ) est donné par une table en fonction de la valeur de ( $n$ ) et, en général, est supérieur à 2,1. Dans certains cas, nous signalons des écarts significatifs avec une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ) ; ( $\tau$ ) est alors, en général, supérieur à 3,1.

Lorsque deux moyennes ( $m \pm e$ ) et ( $m' \pm e'$ ) sont comparées, plusieurs cas peuvent se présenter :

Si  $(e + e') < /m - m'/$ , la différence  $/m - m'/$  est réputée significative.

Si  $(e + e') > /m - m'/$ , deux cas sont possibles :

- ou bien ( $m'$ ) est compris dans l'intervalle de confiance de ( $m$ ) (différence entre  $(m + e)$  et  $(m - e)$  ). Dans ce cas, l'écart  $/m - m'/$  n'est pas significatif.
- ou bien ( $m'$ ) est extérieur à l'intervalle de confiance de ( $m$ ). Dans ce cas, on doit pratiquer le test d'homogénéité de deux moyennes valable pour petits échantillons ( $(n) < 30$ ) décrit dans l'ouvrage de LAMOTTE (67) ; selon les résultats de ce test,  $/m - m'/$  est réputé significatif ou non.

3 -

## R E S U L T A T S

### 3.1 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE TAUX CROISSANCE

Le taux de croissance du poids des rats exercés à la marche est plus faible que celui des rats non exercés (Tableau 1, page 29). Cette différence, peu perceptible lorsque les rats marchent moins de 1200 m par jour, s'accroît lorsque le parcours quotidien atteint ou dépasse cette limite (Figure 2, page 31). Ces observations ont été confirmées par toutes les séries de rats présentées dans les autres chapitres du présent exposé et portent ainsi sur plusieurs centaines de rats.

La différence de régime alimentaire n'influence pas significativement le taux de croissance des animaux non exercés; mais, chez les animaux exercés, la marche semble moins restreindre la croissance lorsque le régime alimentaire contient 20% de saindoux.

La plus lente croissance des rats exercés n'est pas liée à une plus faible consommation de nourriture. Ainsi, nous avons trouvé que les rats exercés de la série 4 (saindoux) consommaient plus de nourriture (+ 70%) que les rats témoins. Dans la série 6 (régime normal), les rats exercés consommaient moins de nourriture (-10%) que les témoins; dans d'autres séries présentées plus loin et ayant reçu le régime normal, les rats ont consommé tantôt plus de nourriture (+ 13%, série 14), tantôt moins (-13%, série 12) que les rats témoins.

### 3.2 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE POIDS DES ORGANES (TESTICULES, SURRENALES, FOIE)

Nous n'avons trouvé aucun écart de poids des testicules entre animaux exercés ou non exercés.

Le poids des surrénales, au contraire, a été trouvé plus fort chez les rats exercés que chez les rats témoins (Tableau 2, page 33).

Le poids du foie semble diminuer pendant la marche, comme l'indiquent les écarts (Tableau 3, page 35) entre les rats A et B ou entre les rats T et T' ; ce résultat est cohérent avec les pertes de glycogène observées par ROHR (68). Chez l'animal élevé sur régime standard, 24 h. après l'exercice, le foie retrouve un poids normal, tandis que chez l'animal recevant du saindoux, l'effet, de l'exercice est plus durable : après 24 h. de repos, le foie du rat A accuse encore une baisse de 15-25 % par rapport au foie du rat témoin T.

L'introduction de 20 % de saindoux dans le régime alimentaire n'apporte aucune modification du poids du foie, des surrénales ou des testicules.

### 3.3. - INFLUENCE DE LA MARCHÉ SUR LE TAUX DE CHOLESTEROL HEPATIQUE (Tableau 4, page 37) ET SUR LA MASSE TOTALE DE CHOLESTEROL HEPATIQUE (Tableau 5, page 39).

L'entraînement régulier à la marche n'a aucun effet sur le ~~taux~~ de cholestérol hépatique (rats A comparés aux rats T), quel que soit le régime alimentaire imposé à l'animal. Mais on observe une augmentation de ce taux chez le rat B ou T' sacrifié juste après l'exercice : ce fait, régulier chez le rat normalement nourri, est peu ou n'est pas visible chez le rat qui reçoit du saindoux.

Toutefois, étant données les variations du poids du foie, les résultats concernant le taux de cholestérol hépatique doivent être complétés par ceux qui regardent la masse totale de cholestérol présente dans le foie. Les données du Tableau 5 montrent que l'influence de l'exercice sur la masse totale de cholestérol hépatique, nulle chez le rat normalement nourri, est très nette chez le rat recevant du saindoux ; le foie du rat entraîné à la marche contient beaucoup moins de cholestérol que le foie du rat témoin.

Le régime gras provoque, dans le foie, une accumulation de cholestérol que la pratique régulière de l'exercice tend à annuler.

3.4 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE TAUX DE CHOLESTEROL  
SERIQUE TOTAL (Tableau 6, page 41) ET SUR LE TAUX D'ES-  
TERIFICATION DU CHOLESTEROL SERIQUE (Tableau 7, page  
43)

En ce qui concerne le taux de cholestérol sérique total, aucun des écarts observés entre les différents groupes de rats (T, A, B, T' d'une même série, n'est significatif avec une probabilité de 95% ( $P < 0,05$ ). Cependant, on peut remarquer que les valeurs obtenues pour les rats sacrifiés juste après l'exercice sont toujours inférieures (de 4 à 10%) aux valeurs obtenues pour les rats homologues pris au repos (rats B comparés aux rats A, rats T' comparés aux rats T) et que certains écarts prennent une signification si l'on retient une probabilité de 65% ( $P < 0,35$ ).

Cette observation est à rapprocher de ce que montre le tableau 7 où sont consignés les taux d'estérification du cholestérol sérique : dans le sérum, la proportion de cholestérol estérifié est plus forte chez le rat qui vient de marcher (B ou T') que chez le rat homologue au repos (les résultats obtenus avec les rats normalement nourris sont ambigus, les rats B présentant le même taux d'estérification que les rats A dans la série 6 et un taux d'estérification significativement plus élevé dans la série 5).

Le taux d'estérification du cholestérol sérique des rats A exercés au repos, est semblable à celui des rats T non exercés, chez les animaux recevant du saindoux, mais nettement inférieur chez les animaux normalement nourris.

Si l'on compare les séries normalement nourries à celles qui reçoivent du saindoux, on observe, chez ces dernières, une nette hypercholestérolémie. En ce qui concerne le taux d'estérification, on ne peut affirmer que le régime gras le modifie chez les rats non exercés, mais il est clair, comme on vient de le voir, que les conséquences de l'exercice sur ce taux, diffèrent sensiblement selon que le régime est normal ou gras.

Tableau 1 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LA CROISSANCE DES RATS

Séries 3, 4, 5, 6, - Taux de croissance des rats témoins non exercés ( T ) et des rats exercés à la marche (E) pendant les six semaines d'expérimentation et Poids de ces rats le jour du sacrifice.

Série 1 - (20 rats non exercés) : taux de croissance des rats recevant une alimentation à 20 % de saindoux et des rats recevant une alimentation normale. Les données de cette série doivent permettre de distinguer les effets de la marche de ceux du régime alimentaire sur les taux de croissance.

Les séries 2 et 7 constituées uniquement d'animaux non exercés recevant la même alimentation, ne figurent pas sur ce tableau.

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série : S, régime à 20 % de saindoux ; N, régime normal. La série 1 comporte 10 rats sur régime S et 10 sur régime N.
- ( b ) Mois pendant lequel a pris fin l'expérience considérée.
- ( c ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( d ) Poids moyen des rats le jour du sacrifice (en g.). On donne la moyenne des poids individuels et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) ; pour la série 4, on donne, entre parenthèses, l'écart maximal probable pour  $P < 0,01$ .
- ( e ) Taux de croissance moyen des rats en grammes par jour.
- ( f ) Rapport des taux de croissance moyens des rats exercés et des rats non exercés (E/T) pendant les premières semaines (parcours imposé inférieur à 1400 m/j. et pendant les trois dernières semaines (parcours supérieur ou égal à 1400 m/j.).

Les valeurs données dans les colonnes (e) et (f) résultent de pesées de groupes entiers d'animaux et non de pesées individuelles. Elles ne peuvent donc être accompagnées d'indication d'erreur standard.

- ( ★ ) ( ★ ★ ) Ecarts significatifs entre les valeurs données pour les rats non exercés T et les valeurs données pour les rats exercés E d'une même série, avec une probabilité de 95 % ( ★ ) ou de 99 % ( ★ ★ ).

Tableau 1 - Légende ci-contre, page 28

| ( a )<br>Série<br>Régime | ( b )<br>mois | ( c )<br>nbre | ( d )<br>Poids des rats (g)           |                                      | ( e )<br>Taux de<br>croissance<br>(g/jour) |     | ( f )<br>Rapport<br>des taux de<br>croissance<br>marche |              |
|--------------------------|---------------|---------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------|--------------|
|                          |               |               | rats T                                | rats E                               | T                                          | E   | <1400<br>m/j                                            | ≥1400<br>m/j |
| 1 S<br>N                 | Juil.         | 20            | 350 $\pm$ 24<br>332 $\pm$ 17          |                                      | 2,6<br>2,5                                 |     |                                                         |              |
| 3 S                      | Juin          | 30            | 204 $\pm$ 21                          | 191 $\pm$ 15                         | 2,2                                        | 1,8 | 0,95                                                    | 0,22         |
| 4 S                      | Fév.          | 49            | 221 $\pm$ 13<br>( $\pm$ 18)<br>( ** ) | 200 $\pm$ 8<br>( $\pm$ 11)<br>( ** ) | 2,7                                        | 2,4 | 0,80                                                    | 0,66         |
| 5 N                      | Juil.         | 42            | 213 $\pm$ 16<br>( ** )                | 191 $\pm$ 12<br>( ** )               | 2,2                                        | 1,5 | 1,00                                                    | 0,30         |
| 6 N                      | Nov.          | 35            | 175 $\pm$ 16                          | 165 $\pm$ 11                         | 2,1                                        | 1,5 | 0,80                                                    | 0,70         |



Figure 2 - Courbe de croissance (série 5)

(\*) - Parcours quotidien imposé aux rats exercés inférieur à 1200 m.

(\*\*) - Parcours de 1200 m/j.

(\*\*\*) - Parcours de 1400 m/j.

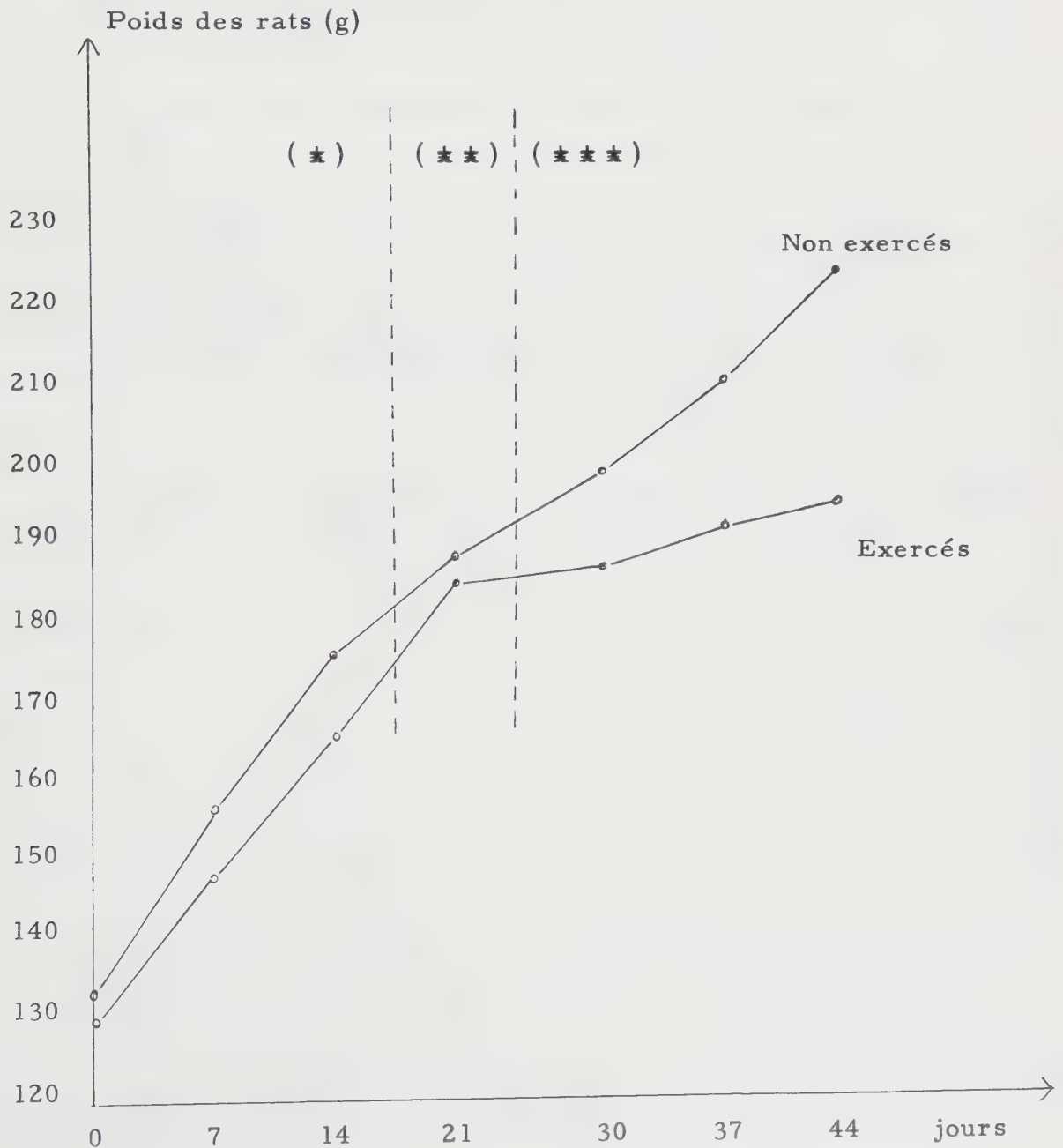


Tableau 2 - INFLUENCE DE LA MARCHÉ SUR LE POIDS DES  
GLANDES SURRÉNALES

Poids des glandes surrénales des rats non exercés (T), des rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), des rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et de rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures, juste avant le sacrifice (T').

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à chaque série : S, régime contenant 20 % de saindoux ;  
N, régime normal.
  - ( b ) Mois pendant lequel a pris fin l'expérience considérée.
  - ( c ) Nombre de rats dans chaque série.
  - ( d ) Pour chaque groupe d'une même série, poids moyen des glandes surrénales, en mg et en pour-cent du poids moyen des surrénales des rats T de la série. - En mg, on donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) ; lorsque cela est nécessaire, l'écart maximal probable pour  $P < 0,01$  est donné entre parenthèses.
- (\*) (\*\*) Ecarts significatifs entre les valeurs données pour les rats A, B ou T' et les valeurs données pour les rats T, avec une probabilité de 95 % (\*) ou de 99 % (\*\*).

Tableau 2 - Légende ci-contre, page 32

| (a)<br>Série<br>Régime | (b)<br>mois | (c)<br>nbre | (d)<br>Poids des surrénales ( mg ) |                        |                                                     |
|------------------------|-------------|-------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|
|                        |             |             | rats T                             | rats A                 | rats B ou T'                                        |
| 2 S                    | déc.        | 28          | 17,5 ± 1,7<br>100%                 |                        | 19,7 ± 1,6 <sup>(T')</sup><br>112%                  |
| 3 S                    | juin        | 30          | 19,7 ± 2,9<br>( ± 4,4 )<br>100%    | 24,0 ± 3,3<br>121% (★) | 26,0 ± 2,6 <sup>(B)</sup><br>( ± 3,8 )<br>132% (★★) |
| 4 S                    | fév.        | 49          | 19,5 ± 1,3<br>100%                 | 22,0 ± 1,6<br>113% (★) | 22,0 ± 2,0 <sup>(B)</sup><br>113%                   |
| 5 N                    | juil.       | 42          | 23,0 ± 1,8<br>100%                 | 25,9 ± 4,9<br>113%     | 29,8 ± 6,0 <sup>(B)</sup><br>129% (★)               |
| 6 N                    | nov.        | 35          | 18,8 ± 1,7<br>100%                 | 25,5 ± 3,2<br>136% (★) | 21,6 ± 3,4 <sup>(B)</sup><br>115%                   |
| 7 N                    | janv.       | 30          | 20,7 ± 2,3<br>100%                 |                        | 20,3 ± 1,8 <sup>(T')</sup><br>98%                   |

Tableau 3 - INFLUENCE DE LA MARCHÉ SUR LE POIDS DU FOIE

Séries 2, 3, 4, 5, 6, 7 - Poids du foie des rats non exercés (T), des rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), des rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et de rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures, juste avant le sacrifice (T').

Série 1 - (20 rats non exercés) : poids du foie des rats recevant une alimentation à 20 % de saindoux et des rats recevant une alimentation normale. Les données de cette série doivent permettre de distinguer les effets de la marche de ceux du régime alimentaire sur le poids du foie.

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série : S, régime à 20 % de saindoux ; N, régime normal. La série 1 comporte 10 rats sur régime S et 10 rats sur régime N.
  - ( b ) Mois pendant lequel a pris fin l'expérience considérée.
  - ( c ) Nombre de rats dans chaque série.
  - ( d ) Pour chaque groupe d'une même série, poids moyen du foie en g. et en pour-cent du poids moyen du foie des rats T de la série. En g., on donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) ; pour la série 3, cet écart est également donné pour  $P < 0,01$  (entre parenthèses).
- ( \* ) ( \*\* ) Ecart significatifs entre les valeurs données pour les rats A, B ou T' et les valeurs données pour les rats T, avec une probabilité de 95 % ( \* ) ou de 99 % ( \*\* ).

Tableau 3 - Légende ci-contre,

| (a) | (b)   | (c) | (d)<br>Poids du foie ( g )              |                                            |                                                              |
|-----|-------|-----|-----------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|     |       |     | rats T                                  | rats A                                     | rats B ou T'                                                 |
| 1   | juil. | 10  | $12,3 \pm 0,8$                          |                                            |                                                              |
|     |       | 10  | $12,1 \pm 1,0$                          |                                            |                                                              |
| 2   | déc.  | 28  | $7,6 \pm 0,5$<br>100%                   |                                            | <sup>(T')</sup><br>$6,9 \pm 0,5$<br>91% (*)                  |
| 3   | Juin  |     | $10,0 \pm 1,1$<br>( $\pm 1,7$ )<br>100% | $7,7 \pm 1,0$<br>( $\pm 1,5$ )<br>76% (**) | <sup>(B)</sup><br>$6,7 \pm 0,8$<br>( $\pm 1,2$ )<br>66% (**) |
| 4   | Fév.  | 49  | $7,7 \pm 0,4$<br>100%                   | $6,7 \pm 0,7$<br>86% (*)                   | <sup>(B)</sup><br>$6,3 \pm 0,6$<br>82% (*)                   |
| 5   | juil. | 42  | $7,5 \pm 0,9$<br>100%                   | $8,0 \pm 1,0$<br>107%                      | <sup>(B)</sup><br>$7,0 \pm 0,8$<br>94%                       |
| 6   | nov   | 35  | $7,2 \pm 0,6$<br>100%                   | $7,2 \pm 0,9$<br>100%                      | <sup>(B)</sup><br>$6,2 \pm 1,0$<br>87%                       |
| 7   | janv. | 30  | $7,9 \pm 0,7$<br>100%                   |                                            | <sup>(T')</sup><br>$7,8 \pm 0,4$<br>98%                      |

Tableau 4 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE TAUX DE CHOLESTEROL HEPATIQUE TOTAL.

Séries 2, 3, 4, 5, 6, 7 - Taux de cholestérol hépatique total des rats non exercés (T), des rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), des rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et de rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures juste avant le sacrifice (T').

Série 1 - (20 rats non exercés) : taux de cholestérol hépatique total des rats recevant une alimentation à 20 % de saindoux et des rats recevant une alimentation normale. Les données de cette série doivent permettre de distinguer les effets de la marche de ceux du régime alimentaire sur le taux de cholestérol hépatique total.

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série : S, régime à 20 % de saindoux ; N, régime normal. La série 1 comporte 10 rats sur régime S et 10 rats sur régime N.
- ( b ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( c ) Pour chaque groupe d'une même série, taux moyen de cholestérol hépatique total en g. de cholestérol par 100 g de tissu frais et en pour-cent du taux moyen de cholestérol hépatique total des rats T de la série. En g/100 g de tissu frais, on donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable. Cet écart est donné, en général, pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ). Pour la série 1, il est donné pour une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ) ; pour la série 6, on le donne pour  $P < 0,05$  et pour  $P < 0,01$  (entre parenthèses).

( ° ) ( °° ) ( \* ) ( ' )

Séries 2, 3, 4, 5, 6, 7 : les écarts significatifs entre les valeurs trouvées pour les rats A et B, sont signalées par ( ° ) ( $P < 0,05$ ) ou ( °° ) ( $P < 0,01$ ).

Les écarts significatifs entre les valeurs trouvées pour les rats A, B ou T' et les valeurs trouvées pour les rats T, sont signalées par ( \* ) ( $P < 0,05$ ).

Série 1 - ( ' ) : écart significatif ( $P < 0,01$ ) entre les valeurs trouvées pour les rats recevant le régime à 20 % de saindoux et les valeurs trouvées pour les rats recevant le régime normal.

Tableau 4 - Légende ci-contre, page 36

| (a)<br>Série<br>régime | (b)<br>nbre | (c)<br>Taux de cholestérol hépatique total (g/100 g) |                                                  |                                                          |
|------------------------|-------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                        |             | rats T                                               | rats A                                           | rats B ou T'                                             |
| 1                      | S 10        | $0,262 \pm 0,030$<br>(')                             |                                                  |                                                          |
|                        | N 10        | $0,195 \pm 0,016$                                    |                                                  |                                                          |
| 2                      | S 28        | $0,250 \pm 0,016$<br>100%                            |                                                  | $0,293 \pm 0,016$<br>117% (★) (T')                       |
| 3                      | S 30        | $0,250 \pm 0,017$<br>100%                            | $0,249 \pm 0,018$<br>100%                        | $0,258 \pm 0,013$<br>103% (B)                            |
| 4                      | S 49        | $0,293 \pm 0,014$<br>100%                            | $0,283 \pm 0,012$<br>97%                         | $0,285 \pm 0,013$<br>97% (B)                             |
| 5                      | N 42        | $0,212 \pm 0,016$<br>100%                            | $0,214 \pm 0,011$<br>101% (°)                    | $0,243 \pm 0,021$<br>115% (★)(°) (B)                     |
| 6                      | N 35        | $0,242 \pm 0,008$<br>( $\pm 0,011$ )<br>100%         | $0,233 \pm 0,017$<br>( $\pm 0,025$ )<br>96% (°°) | $0,266 \pm 0,014$<br>( $\pm 0,020$ )<br>110% (★ (°°) (B) |
| 7                      | N 30        | $0,251 \pm 0,013$<br>100%                            |                                                  | $0,265 \pm 0,012$<br>105% (T')                           |

Tableau 5 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LA MASSE DE  
CHOLESTEROL PRESENTE DANS LE FOIE.

Séries 2, 3, 4, 5, 6, 7 : Masse de cholestérol total (estérifié et non estérifié), présente au moment du sacrifice, dans le foie des rats non exercés (T), des rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), des rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et de rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures juste avant le sacrifice (T').

Série 1 (20 rats non exercés) : masse de cholestérol total présente, au moment du sacrifice, dans le foie des rats recevant une alimentation à 20 % de saindoux et des rats recevant une alimentation normale. Les données de cette série doivent permettre de distinguer les effets de la marche de ceux du régime alimentaire sur la masse de cholestérol présente dans le foie.

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série : S, régime à 20 % de saindoux ; N, régime normal. La série 1 comporte 10 rats sur régime S et 10 rats sur régime N.
- ( b ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( c ) Pour chaque groupe d'une même série, masse moyenne de cholestérol total présente dans le foie au moment du sacrifice, en mg et en pour-cent de la masse moyenne trouvée chez les rats T de la série. En mg, on donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) ou (séries 1 et 3), pour une probabilité de 99 % ( $P < 0,001$ ).
- ( ★ ) ( ★ ★ ) Ecart significatif entre les valeurs trouvées pour les rats A, B ou T' et les valeurs trouvées pour les rats T de la même série, avec une probabilité de 95 % ( ★ ) ou de 99 % ( ★ ★ )
- ( ' ) Ecart significatif, avec une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ) entre les valeurs trouvées pour les rats recevant le régime à 20 % de saindoux et les valeurs trouvées pour les rats recevant le régime normal.

Tableau 5 - Légende ci-contre, page 38

| (a)<br>Série<br>régime | (b)<br>nbre | (c)<br>Masse de cholestérol présente dans le foie (mg) |                                 |                                     |
|------------------------|-------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|                        |             | rats T                                                 | rats A                          | rats B ou T'                        |
| 1                      | S 10        | $31,6 \pm 6,1$<br>(')                                  |                                 |                                     |
|                        | N 10        | $24,2 \pm 2,1$                                         |                                 |                                     |
| 2                      | S 28        | $19,2 \pm 2,2$<br>100%                                 |                                 | $20,2 \pm 1,7$ (T')<br>106%         |
| 3                      | S 30        | $25,3 \pm 6,0$<br><br>100%                             | $18,3 \pm 2,9$<br><br>72% (✱ ✱) | $17,7 \pm 3,1$ (B)<br><br>70% (✱ ✱) |
| 4                      | S 49        | $21,8 \pm 2,3$<br><br>100%                             | $18,4 \pm 1,6$<br><br>84% (✱)   | $18,0 \pm 1,5$ (B)<br><br>82% (✱)   |
| 5                      | N 42        | $15,8 \pm 1,9$<br><br>100%                             | $17,2 \pm 2,4$<br><br>109%      | $16,9 \pm 2,0$ (B)<br><br>107%      |
| 6                      | N 35        | $17,3 \pm 1,2$<br><br>100%                             | $16,8 \pm 2,6$<br><br>97%       | $16,4 \pm 2,4$ (B)<br><br>95%       |
| 7                      | N 30        | $19,9 \pm 1,9$<br><br>100%                             |                                 | $20,5 \pm 1,4$ (T')<br><br>103%     |

Tableau 6 - INFLUENCE DE LA MARCHÉ SUR LE TAUX DE CHOLESTEROL SÉRIQUE TOTAL.

Taux de cholestérol sérique total (estérifié et non estérifié) des rats non exercés (T), des rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), des rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et de rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures juste avant le sacrifice (T').

- ( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série : S, régime contenant 20 % de saindoux ; N, régime normal.
- ( b ) Mois pendant lequel a pris fin l'expérience considérée.
- ( c ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( d ) Pour chaque groupe d'une même série, taux moyen de cholestérol sérique total en mg de cholestérol pour 100 ml de serum. On donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ).

Les taux de cholestérol sérique total sont également exprimés, pour les rats B, en pour-cent de la valeur trouvée chez les rats A et, pour les rats T', en pour-cent de la valeur trouvée chez les rats T de la même série. Les rats A et B sont tous entraînés à la marche, mais, au moment du sacrifice, les rats A sont au repos tandis que les rats B viennent de marcher. Les rats T et T' ne sont pas entraînés à la marche mais, au moment du sacrifice, les rats T sont au repos et les rats T' viennent de marcher (c'est leur seule marche pendant les six semaines que dure l'expérience).

Tableau 6 - Légende ci-contre, page 40

| (a)<br>Série<br>régime | (b)<br>mois | (c)<br>nbre | (d)<br>Taux de cholestérol sérique total<br>(mg/100 ml) |                        |                               |
|------------------------|-------------|-------------|---------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
|                        |             |             | rats T                                                  | rats A                 | rats B ou T'                  |
| 2 S                    | déc.        | 28          | 65,5 $\pm$ 8,5<br>100%                                  |                        | (T')<br>61,1 $\pm$ 6,8<br>93% |
| 3 S                    | juin        | 30          | 59,4 $\pm$ 9,4                                          | 62,0 $\pm$ 6,6<br>100% | (B)<br>55,4 $\pm$ 5,0<br>90%  |
| 4 S                    | fév.        | 49          | 76,4 $\pm$ 6,9                                          | 73,8 $\pm$ 7,0<br>100% | (B)<br>67,8 $\pm$ 5,3<br>92%  |
| 5 N                    | juil.       | 42          | 44,5 $\pm$ 6,1                                          | 43,3 $\pm$ 6,9<br>100% | (B)<br>40,2 $\pm$ 5,8<br>93%  |
| 6 N                    | nov.        | 35          | 42,6 $\pm$ 4,7                                          | 45,1 $\pm$ 5,8<br>100% | (B)<br>43,3 $\pm$ 4,5<br>96%  |
| 7 N                    | janv.       | 30          | 51,2 $\pm$ 3,2<br>100%                                  |                        | (T')<br>47,0 $\pm$ 3,4<br>92% |

Tableau 7 - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE TAUX D'ESTERIFICATION DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE.

Rapport de la masse de cholestérol estérifié à la masse de cholestérol total, par ml de serum, pour les rats non exercés (T), les rats exercés sacrifiés 24 h. après leur dernière marche (A), les rats exercés sacrifiés immédiatement après une marche de 2800 m en deux heures (B) et pour des rats non exercés obligés de marcher 1900 m en deux heures, juste avant le sacrifice (T').

( a ) Numéro de la série et régime alimentaire imposé à cette série :  
S, régime contenant 20 % de saindoux ; N, régime normal.

( b ) Mois pendant lequel a pris fin l'expérience considérée.

( c ) Nombre de rat dans chaque série.

( d ) Taux moyen d'estérification du cholestérol sérique. On donne la moyenne des valeurs individuelles observées pour le rapport des masses de cholestérol estérifié et de cholestérol total, par ml de serum ; on donne aussi l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ). Lorsque cela est nécessaire, cet écart est également donné pour une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ) (entre parenthèses).

La valeur moyenne du rapport est également exprimée, pour chaque groupe d'une même série, en pour-cent de la valeur observée chez les rats T de la série.

( ° ) ( °° ) Ecart significatif entre les valeurs trouvées pour les rats A et B, avec une probabilité de 95 % ( ° ) ou de 99 % ( °° ).

( ★ ) ( ★★ ) Ecart significatif entre les valeurs trouvées pour les rats A, B ou T' et les valeurs trouvées pour les rats T de la même série, avec une probabilité de 95 % ( ★ ) ou de 99 % ( ★★ ).

Le cholestérol sérique de la série 1 n'a pas été dosé.

La série 7 a été perdue sur incident technique au moment du dosage.

Tableau 7 - Légende ci-contre, page 42

| (a)<br>série<br>régime | (b)<br>mois | (c)<br>nbre | (d)<br>Taux d'estérification du cholestérol sérique<br>(chol. estérifié/ chol. total) |                                          |                                                 |
|------------------------|-------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                        |             |             | rats T                                                                                | rats A                                   | rats B ou T'                                    |
| 2 S                    | déc.        | 28          | 0,45 ± 0,04<br><br>100%                                                               |                                          | (T')<br>0,53 ± 0,05<br><br>118%                 |
| 3 S                    | juin        | 30          | 0,65 ± 0,14<br><br>100%                                                               | 0,61 ± 0,06<br><br>94%                   | (B)<br>0,68 ± 0,08<br><br>105%                  |
| 4 S                    | fév.        | 49          | 0,56 ± 0,08<br><br>100%                                                               | 0,56 ± 0,09<br><br>100% (°)              | (B)<br>0,81 ± 0,07<br><br>145% (°) (★)          |
| 5 N                    | juil.       | 42          | 0,65 ± 0,19<br><br>100%                                                               | 0,46 ± 0,09<br>( ± 0,13)<br><br>70% (°°) | (B)<br>0,64 ± 0,11<br>( ± 0,16)<br><br>98% (°°) |
| 6 N                    | nov.        | 35          | 0,74 ± 0,06<br>(± 0,09)<br><br>100%                                                   | 0,55 ± 0,08<br>(± 0,11)<br><br>74% (★ ★) | (B)<br>0,53 ± 0,12<br>( ± 0,19)<br><br>72% (★★) |

4 -

## DISCUSSION DES RESULTATS

### REVISION DE L'HYPOTHESE DE DEPART

De tous les faits observés, le plus marquant est la baisse importante des réserves hépatiques de cholestérol, chez le rat exercé, lorsque le régime alimentaire contient 20 % de saindoux : cette donnée implique certainement une activation du catabolisme hépatique du cholestérol, sans donner d'indications sur la cholestérogénèse. Mais on peut momentanément admettre que l'activation du catabolisme doit s'accompagner d'une activation plutôt que d'une inhibition de l'anabolisme.

En faveur d'une accélération du catabolisme, plaide également l'hypertrophie des surrénales provoquée par la marche ; on peut, avec prudence, présumer que cette hypertrophie est liée à une activité accrue et, en particulier, à une production plus forte d'hormones à partir du cholestérol.

Les résultats acquis au sujet des réserves hépatiques de cholestérol, chez le rat normalement nourri, n'impliquent pas un accroissement du catabolisme comme chez le rat engraisé au saindoux ; l'explication la plus simple des données est que l'influence de la marche est égale sur la synthèse et la dégradation hépatique du cholestérol, qu'elle soit nulle, positive ou négative. Toutefois, il est possible d'admettre que l'intervention du travail sur le métabolisme du cholestérol, si elle existe, s'exerce selon le même mécanisme chez tous les rats, quel que soit le régime alimentaire ; il est alors logique d'accepter, chez le rat normalement nourri, comme conséquence de l'exercice, une accélération du catabolisme hépatique du cholestérol, semblable à celle que montre le rat exercé nourri au saindoux.

Mais l'acceptation de cette similitude entraîne implicitement, à la suite de nos précédentes remarques, qu'on admette une accélération de la cholestérogénèse hépatique chez le rat normalement nourri et aussi, chez le rat élevé sur régime gras.

L'hypothèse de travail qui semble découler avec le plus de vraisemblance des résultats présentés jusqu'ici est donc, à l'opposé de notre hypothèse initiale, celle d'une activation, par l'exercice, de la cholestérogénèse hépatique du cholestérol et de son catabolisme dans le foie et les glandes surrénales.

Il est risqué de chercher une confirmation de notre hypothèse dans les résultats des déterminations de cholestérol sérique dont l'interprétation est délicate. Nous ne pouvons, non plus, faute de renseignements sur la genèse et la circulation du cholestérol extra-hépatique, rendre raison de l'accumulation de cholestérol dans le foie des rats nourris au saindoux. Il nous suffit, pour l'instant, de constater qu'aucun des résultats enregistrés n'infirmes notre hypothèse dont la mise à l'épreuve a fourni le thème de nos recherches ultérieures : étude de la biogénèse puis du catabolisme hépatiques du cholestérol.



## CH A P I T R E      S E C O N D

---

INFLUENCE DE LA MARCHE SUR L'INCORPORATION "in vitro "  
DE L'ACETATE DE SODIUM-1-<sup>14</sup>C DANS LE CHOLESTEROL PAR  
DES TRANCHES DE FOIE ET SUR LA PRODUCTION " in vitro " DE  
NADPH PAR UNE FRACTION D'HOMOGENAT DE FOIE.



1 -

## I N T R O D U C T I O N

Lorsque nous avons entrepris de contrôler l'hypothèse d'une accélération de la cholestérogénèse hépatique sous l'influence de l'exercice, un premier choix s'est imposé, celui du régime alimentaire : l'expérimentation, devenant plus précise, ne pouvait, faute de temps, être poursuivie simultanément sur des animaux normalement nourris et sur d'autres recevant un régime à 20% de saindoux. Le régime "normal", plus facilement reproductible, plus aisément comparable aux régimes standards utilisés par de nombreux chercheurs et peut-être moins éprouvant pour l'organisme, a été seul retenu pour toutes les expériences présentées dans ce chapitre et le suivant.

Pour la mesure de l'activité cholestérogénique du foie, nous avons adopté une méthode radiochimique. Le choix du traceur ( $^{14}\text{C}$ ) et du substrat de synthèse (acétate de sodium-1- $^{14}\text{C}$ ) a été effectué en tenant compte de l'équipement disponible, de la commodité d'emploi et de l'efficacité du marquage : de très nombreuses expériences décrites dans la littérature montrent que l'acétate est très rapidement utilisé par le foie pour la synthèse du cholestérol.

La nécessité absolue d'éviter toute fuite du traceur et toute contamination non contrôlée, et les limites de nos possibilités d'équipement, nous interdisaient l'utilisation de l'acétate marqué avant l'exercice : l'acétate devait nécessairement intervenir après la dernière marche des rats B. Son utilisation "in vivo" perdait, de ce fait, son principal avantage. Son emploi "in vitro", en revanche, permettait un meilleur contrôle de la matière radioactive, donc une meilleure sécurité, et se prêtait mieux à un travail en série. Nous avons donc préféré opérer "in vitro".

Pour que les conditions expérimentales s'éloignent le moins possible des conditions physiologiques, nous avons utilisé le foie sous forme de tranches, sans congélation préalable.

Nous avons mis ces tranches en incubation dans un milieu approprié, en présence d'acétate de sodium marqué : l'activité spécifique du cholestérol obtenu devait nous renseigner sur l'activité cholestérogénique du foie traité.

Nous avons trouvé que la marche influençait la vitesse de formation du cholestérol à partir de l'acétate. Il était possible de supposer que cette influence s'exerçait, au moins partiellement, par une action sur la formation de NADPH, notamment par la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase (EC : 1.1.1.49) hépatique. En effet, la cholestérogénèse, qui consomme du NADPH (20 à 22), semblait, à la suite des travaux de SIPERSTEIN (23), étroitement liée à l'activité du cycle des pentoses. Pour contrôler cette hypothèse, nous avons tenté de déterminer l'influence de l'exercice sur l'activité du cycle des pentoses dans le foie. La méthode que nous avons utilisée consiste en une mesure spectrophotométrique de la vitesse de formation de NADPH par un extrait de foie, en présence de Glucose-6-phosphate et de NADP.

La nécessité de contrôler une éventuelle interférence de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase des érythrocytes retenus dans le foie, nous a conduits à effectuer quelques déterminations accessoires : volume moyen de sang retenu par gramme de foie (par comparaison des taux de fer du sang et du foie) et activité de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase des érythrocytes de sang veineux.

## 2 - TECHNIQUES

### 2.1. - MESURE DE LA VITESSE D'INCORPORATION DE L'ACETATE DE SODIUM-1-14 C DANS LE CHOLESTEROL PAR DES TRANCHES DE FOIE.

#### 2.1.1. - Incubation de tranches de foie en présence d'acétate radioactif

La littérature nous fournissait les données essentielles : composition du milieu d'incubation, température et pH optima (38°C, pH compris entre 6,9 et 7,2), conditions optimales de concentration en acétate et de masse de tissu (72-73). Mais les protocoles opératoires décrits permettaient difficilement un travail en série. Il nous fallait mettre au point une technique qui, en sauvegardant une bonne reproductibilité, fût simple et rapide. Nous avons étudié l'influence que pouvaient avoir sur la reproductibilité des résultats, des facteurs aussi divers que la masse de foie incubé, le nombre et la dimension des tranches, la technique de découpe, le volume de tampon, la qualité de l'eau, la masse de précurseur, la composition de la phase gazeuse au-dessus du milieu d'incubation, la technique d'élimination du gaz carbonique et le mode d'agitation. Ces études nous ont conduits à un protocole expérimental original. Le foie, prélevé rapidement sur l'animal décapité, est découpé immédiatement au scalpel sur une lame de liège neuve; une soixantaine de petites tranches (1g environ; épaisseur : 0,5 mm environ) sont mises en incubation, en atmosphère d'oxygène, dans 10 ml d'un milieu tamponné (Krebs-Ringer phosphate, pH 7,10) contenant 10 mg d'acétate de sodium-1-<sup>14</sup>C (de 0,080 à 0,340 mC/mM, selon les expériences; concentration :  $12,2 \cdot 10^{-3}$  M).

Il s'écoule 2 mn 30 s entre le moment où le rat est décapité et le moment où les coupes de foie sont placées dans le milieu d'incubation. Celui-ci se trouve dans des erlenmeyers de 50 ml, fermés au caoutchouc, munis d'un réservoir central cylindrique contenant 0,3 ml d'une solution de potasse 20 %. L'erien (taré juste avant le sacrifice de l'animal) est pesé rapidement ; l'air y est remplacé par de l'oxygène sous pression atmosphérique et on le place dans un bain thermostaté à 38° C où il est soumis à une agitation latérale permanente. La durée d'incubation est de 3 heures, après lesquelles l'activité biologique est bloquée par addition de potasse hydroalcoolique.

La programmation de ces opérations a été minutieusement établie pour autoriser l'utilisation simultanée de trois rats (un rat T, un rat A, un rat B) puis de six rats (2 rats T, 2 rats A, 2 rats B).

2.1.2. - Extraction, purification et détermination de l'activité spécifique du cholestérol - U - <sup>14</sup> C

Le contenu de l'erien d'incubation est transféré dans un ballon de 500 ml. Le cholestérol est saponifié, extrait par l'éther et mis en solution chloroformique selon le protocole décrit ailleurs (page 18) auquel nous avons apporté de légères modifications : pour réduire la manipulation de substances hautement radioactives, nous n'avons pas broyé les tranches de foie avant saponification (la dissolution dans la potasse n'en est pas modifiée) ; et, pour éliminer l'acétate précurseur de la solution étherée de cholestérol, nous avons fait précéder les lavages à l'eau d'un lavage à la soude 2 N (préférable à la potasse toujours légèrement radioactive). Dans ces conditions, la solution de cholestérol ne retient qu'une très faible partie de l'acétate dont il ne reste que d'infimes traces après évaporation de l'éther.

L'extrait brut ainsi obtenu est purifié par chromatographie en couche mince. Cette technique a été choisie pour les excellentes séparations qu'elle permet et pour sa mise en oeuvre relativement rapide autorisant des opérations en série. Une étude prolongée des systèmes phase fixe-phase mobile susceptibles de convenir à notre projet, nous a permis d'en sélectionner sept (Tableau 8, page 57) qui, dans les mêmes conditions d'épaisseur de couche et d'activation, présentent, pour une même substance, des Rf très variés (Tableaux 9 et 10, pages 59 et 60) (figures 3 et 4, pages 63 et 65).

La purification a été réalisée par l'emploi successif du système I et du système II. Les autres systèmes ont été ensuite utilisés pour le contrôle du degré de pureté obtenu.

La couche mince est préparée un ou plusieurs jours avant son emploi à l'aide de Kieselgel G Merck et d'eau (7g pour 14 ml) ou d'Alumine Merck et d'eau (10 g pour 15 ml); ce mélange homogénéisé est appliqué, en couche de 200-250 $\mu$ , sur une plaque de verre de 20 x 25 cm que l'on conserve à l'abri de la poussière. Juste avant son utilisation, la couche mince est activée par chauffage 30 mn à l'étuve à 115°C; lorsque, après la sortie de l'étuve, la plaque s'est suffisamment refroidie (30 - 40°C), on y dépose la solution chloroformique de cholestérol, à 4 cm du bord inférieur, en une bande continue, avec une pipette à pointe fine. L'extrait de un gramme de foie est réparti sur deux plaques de façon que la masse de cholestérol par plaque soit de l'ordre de un mg.

Le développement des chromatogrammes est effectué dans de grandes cuves de verre pyrex, fermées, pouvant recevoir chacune six plaques. Il est interrompu lorsque le front du solvant est à environ 18 cm de la ligne de départ. La durée de cette opération, à température ordinaire, est d'environ 1 h. 30. Les plaques, sorties des cuves, sont disposées sous une hotte où on laisse le solvant s'évaporer. On les place ensuite dans une cuve fermée en présence d'iode dont les vapeurs se fixent de façon plus ou moins labile sur les substances séparées. La bande de cholestérol, devenue visible, est délimitée à l'aide d'une lame de scalpel propre. On laisse alors à l'iode fixé sur le cholestérol, le temps de se sublimer.

Le silicagel (ou l'alumine) fixant le cholestérol est gratté à l'aide d'une lame suffisamment rigide de teflon ou d'acier inoxydable, recueilli sur une feuille de papier propre puis placé dans un erlen de 50 ml; six fois de suite, cet erlen reçoit une petite quantité de chloroforme qu'on porte à ébullition sur un bain marie à 65-70°C et qu'on filtre sur papier. La solution chloroformique de cholestérol, reçue dans un autre erlen de 50 ml, est évaporée à 65°C; le résidu est repris par du chloroforme : un ml si la solution est destinée à subir la seconde chromatographie ou environ 2, 3 ml si la solution est destinée au dosage. De cette solution finale de cholestérol pur, on prélève, avec la même pipette de précision, un ml dans une coupelle d'aluminium et un ml dans un tube à essai. La coupelle, séchée aux rayons I. R. puis dans un dessiccateur en présence de P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>, est soumise au comptage dans un compteur Geiger sans fenêtre à courant d'Argon et dans un compteur Geiger à fenêtre.

Le contenu du tube à essai est destiné au dosage colorimétrique (page 21). Le rapport du compte par minute obtenu pour la coupelle, à la masse décelée par colorimétrie donne l'activité spécifique en coups ou impulsions par minute et par mg (cpm/mg). Lorsqu'on doit opérer un contrôle de pureté par chromatographie ou un contrôle de reproductibilité du comptage, le volume de la solution chloroformique est amené non à 2,3 ml, mais à 3,3 ml ou 4,3 ml. Un ml de solution est prélevé, toujours avec la même pipette, dans une seconde coupelle ou bien l'excès de solution est utilisé pour la chromatographie.

### 2.1.3. - Contrôle de la pureté du cholestérol radioactif soumis aux comptages.

La pureté du cholestérol soumis aux comptages a été très soigneusement contrôlée de différentes manières :

- Nous avons fait défiler sous la fenêtre d'un compteur enregistreur automatique, des plaques chromatographiques aux dimensions appropriées ( 6 x 25 cm ) ; les courbes d'activité enregistrées montrent que l'activité est principalement (à plus de 60 %) située sur la tache de cholestérol au cours de la première chromatographie, qu'elle l'est presque entièrement lors de la seconde chromatographie et totalement si l'on fait une troisième chromatographie avec un des systèmes III, IV, V, VI ou VII (Tableau 8, page 57 ; figures 3 et 5, pages 63 et 65). Nous avons, de la même façon, vérifié que l'acétate précurseur ( $R_f$  0,00) dont il ne peut rester que des traces infimes, est séparé du cholestérol dès la première chromatographie ( $R_f$  du cholestérol : 0,50) (figure 4, page 65 ; tableau 9, page 59).

- Nous avons soumis le cholestérol purifié à une chromatographie supplémentaire dans un des systèmes III à VII. Nous avons, d'une part, enregistré l'activité des chromatogrammes, comme nous venons de le signaler ; nous avons, d'autre part, révélé ces chromatogrammes de différentes manières (iode, acide sulfurique, bleu de bromothymol, Rhodamine B, trichlorure d'antimoine, acide phosphomolybdique, aldéhyde p. anisique) sans trouver d'autre tache que celle de cholestérol ; enfin, nous avons vérifié que cette purification supplémentaire ne modifiait pas l'activité spécifique du cholestérol, que celui-ci ait été dilué ou non, avant chromatographie, par du cholestérol pur inerte (Tableau 11, page 61).

- Cette activité spécifique ne varie pas davantage si le cholestérol, après dilution, est recristallisé dans le Méthanol (Tableau 12, page 62).

- Enfin, les bandes d'adsorbant contiguës à la bande de cholestérol et contenant les franges son récupérées de cholestérol, donnent, après élution, de 10 à 20 fois moins d'impulsions par minute que le cholestérol lui-même, pour la première chromatographie, et 30 fois moins, pour la seconde chromatographie.

La place occupée par cette technique chromatographique dans nos méthodes de purification et de contrôle, exigeait une étude des interférences éventuelles, dans le dosage colorimétrique, de la révélation aux vapeurs d'iode. En effet, des traces d'iode conduisent à des erreurs par défaut sur la masse de cholestérol. Il est donc nécessaire de veiller à la sublimation totale de l'iode avant d'éluer le cholestérol. Moyennant cette précaution, la révélation à l'iode n'a aucune influence sur le résultat final, comme l'a remarqué MATTHEWS (79) et comme nous l'avons vérifié à plusieurs reprises et, en particulier, à l'aide de cholestérol radioactif pour lequel nous avons trouvé la même activité spécifique avant et après chromatographie, avec ou sans révélation à l'iode.

Tableau 8 - Systèmes "phase fixe-phase mobile" utilisés en chromatographie sur couche mince pour la purification et le contrôle de pureté du cholestérol radioactif formé par des tranches de foie à partir d'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$ .

- ( a ) Numéro des systèmes phase fixe-phase mobile utilisés.
- ( b ) Support ou phase fixe : Silicagel Merck ou Alumine Merck pour chromatographie en couche mince.
- ( c ) Phase mobile : mélange de solvants utilisé pour le développement des chromatogrammes.
- ( d ) Références bibliographiques.

Les systèmes VI et VII ont été conçus (76) pour séparer les stér<sup>o</sup>ls en fonction du degré d'insaturation du noyau ou de la chaîne latérale. Ils permettent, en particulier, de séparer le cholestérol de ses précurseurs immédiats dont le Desmostérol.

Tableau 8 - Légende ci-contre, page 56

| (a)<br>Numéro du<br>système | (b)<br>Support | (c)<br>Phase mobile                                                    | (d)<br>Réf.<br>bibl. |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| I                           | Silicagel      | Dichloro-1,2 -éthane /<br>Méthanol<br>98/2 vol.                        | 74                   |
| II                          | Silicagel      | Ether de pétrole/méthyl-<br>éthyl-cétone/Acide acétique<br>95/4/1 vol. | 75                   |
| III                         | Alumine        | Dichloro-1,2-éthane /<br>Acétate d'éthyle<br>99,5/0,5 vol.             | person-<br>nel       |
| IV                          | Silicagel      | Cyclohexane /Chloroforme<br>50/50 vol.                                 | 77                   |
| V                           | Silicagel      | Cyclohexane / Acétate d'éthyle<br>70/30 vol.                           | 78                   |
| VI                          | Silicagel      | Cyclohexane/Acétate d'éthyle/Eau<br>600/400/1 vol.                     | 76                   |
| VII                         | Silicagel      | Cyclohexane / Acétate d'éthyle /<br>Eau<br>1560/440/1 vol.             | 76                   |

Tableau 9 - Rf observés pour diverses substances dans les différents systèmes de développement utilisés en chromatographie en couche mince pour la purification du cholestérol radio-actif formé par des tranches de foie à partir d'acétate marqué.

(a) Numéros des systèmes phase fixe-phase mobile utilisés. La composition de ces systèmes est donnée dans le tableau 8, page 57.

(b) Rf observés pour les substances désignées :

CST : cholestérol

Ol. : acide oléique

Ac.gras : acide linoléique, acide palmitique et acide caprylique

Vit. A : acétate de Vitamine A

Lan. : Lanostérol

Sq. : squalène

Ac. : acétate de sodium

Durée du développement : 1 h. 30 pour les systèmes I à V

2 h. pour les systèmes VI et VII

Tableau 9 - Légende ci-contre, page 58

| (a)<br>N° du<br>système | (b)<br>CST   | (b)<br>Ol.   | (b)<br>Ac.<br>gras | (b)<br>vit. A | (b)<br>Lan. | (b)<br>Sq. | (b)<br>Ac. |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------------|---------------|-------------|------------|------------|
| I                       | 0,45<br>0,55 | 0,30<br>0,35 |                    |               | 0,65        | 1,00       | 0,00       |
| II                      | 0,11<br>0,15 | 0,30<br>0,40 | 0,30<br>0,40       | 0,55<br>0,60  | 0,25        | 1,00       |            |
| III                     | 0,35<br>0,40 | 0,00         |                    |               |             |            |            |
| IV                      | 0,10<br>0,11 | 0,06<br>0,09 |                    |               |             |            |            |
| V                       | 0,35         |              |                    |               |             |            |            |
| VI                      | 0,8<br>0,9   |              |                    |               |             |            |            |
| VII                     | 0,5          |              |                    |               |             |            |            |

Tableau 10 - Rf observés dans les systèmes I, III, IV de développement des chromatogrammes en couche mince, pour les substances séparées par le système II.

La composition des systèmes "phase fixe-phase mobile" de développement est donnée dans le tableau 8, page 57.

Des extraits de foie ont été développés dans le système II. Les chromatogrammes ont été divisés en cinq bandes, perpendiculairement au sens de développement; les substances fixées sur chacune de ces bandes ont été éluées séparément puis chromatographiées à nouveau avec les systèmes I, III, IV.

Durée du développement : 1 h. 30

|                           |                    |                    |                                    |                            |                |
|---------------------------|--------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------|
| Rf dans le système<br>II  | 0,00               | 0,08<br>à 0,11     | 0,11<br>à 0,17<br>chole-<br>stérol | 0,17<br>à 0,40             | 0,40<br>à 1,00 |
| Rf. dans le système<br>I  | 0,00<br>et<br>0,10 | 0,13<br>et<br>0,18 | 0,55                               | 0,15<br>0,80<br>et<br>0,90 | 0,95           |
| Rf dans le système<br>III | 1,00<br>1,00       | 0,03<br>et<br>0,95 | 0,45                               | 0,00<br>0,95               | 0,00<br>0,95   |
| Rf dans le système<br>IV  | 0,00               | 0,00               | 0,09                               | 0,06<br>et<br>0,15         | 0,30           |

Tableau 11 - Activité spécifique du cholestérol formé par des tranches de foie à partir d'acétate de sodium-1- $^{14}\text{C}$  et purifié par double chromatographie en couche mince, avant et après une troisième chromatographie de contrôle dans les systèmes de développement III et IV.

La composition des systèmes de développement est donnée dans le tableau 8, page 57.

Les comptages sont effectués dans un compteur Geiger sans fenêtre à circulation d'Argon. Les activités spécifiques sont données en coups par minute et par mg (cpm/mg).

Durée du développement : 1 h. 30

- a) Numéro du contrôle : sept contrôles ont été effectués.
- b) Numéro du système de développement utilisé pour chaque contrôle.  
Les sept contrôles ont été effectués sur quatre lots différents de cholestérol. Le premier lot n'a donné lieu qu'à un seul contrôle, les suivants ont subi deux contrôles (un avec le système III, un autre avec le système IV)
- c) Activité spécifique du cholestérol avant la chromatographie de contrôle.
- d) Activité spécifique du cholestérol après la chromatographie de contrôle.

|                            |        |         |         |         |
|----------------------------|--------|---------|---------|---------|
| (a) contrôle               | I      | 2 et 3  | 4 et 5  | 6 et 7  |
| (b) système                | III    | III IV  | III IV  | III IV  |
| Act. Spéc.<br>AVANT<br>(c) | 54 500 | 360     | 270     | 290     |
| Act. Spéc.<br>APRES        | 54 700 | 350 340 | 255 285 | 305 310 |

Tableau 12 - Activité spécifique, avant et après cristallisation dans le méthanol, du cholestérol formé par des tranches de foie à partir d'acétate de sodium-1-<sup>14</sup>C et purifié par double chromatographie en couche mince.

Treize contrôles ont été effectués sur treize lots différents de cholestérol. Le cholestérol radioactif purifié a été dilué par du cholestérol pur inerte avant d'être cristallisé. Les activités spécifiques trouvées après cristallisation ont été multipliées par le facteur de dilution : toutes les activités spécifiques sont données telles qu'elles seraient sans la dilution (en coups par minute et par mg, au compteur Geiger à fenêtre).

| Numéro<br>du<br>contrôle | Activité spécifique           |                               | Numéro<br>du<br>contrôle | Activité spécifique           |                               |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                          | AVANT<br>cristal-<br>lisation | APRES<br>cristal-<br>lisation |                          | AVANT<br>cristal-<br>lisation | APRES<br>cristal-<br>lisation |
| 1                        | 1860                          | 1870                          | 8                        | 3190                          | 3130                          |
| 2                        | 1365                          | 1340                          | 9                        | 2750                          | 2680                          |
| 3                        | 1265                          | 1320                          | 10                       | 5350                          | 5380                          |
| 4                        | 1310                          | 1300                          | 11                       | 2380                          | 2410                          |
| 5                        | 1250                          | 1220                          | 12                       | 1620                          | 1680                          |
| 6                        | 2180                          | 2200                          | 13                       | 2070                          | 2090                          |
| 7                        | 1270                          | 1270                          |                          |                               |                               |

Figure 3 - Chromatogrammes et enregistrement de la radioactivité de chromatogramme d'extraits de tranches de foie placées, pendant 3 h. en incubation avec de l'acétate radioactif.

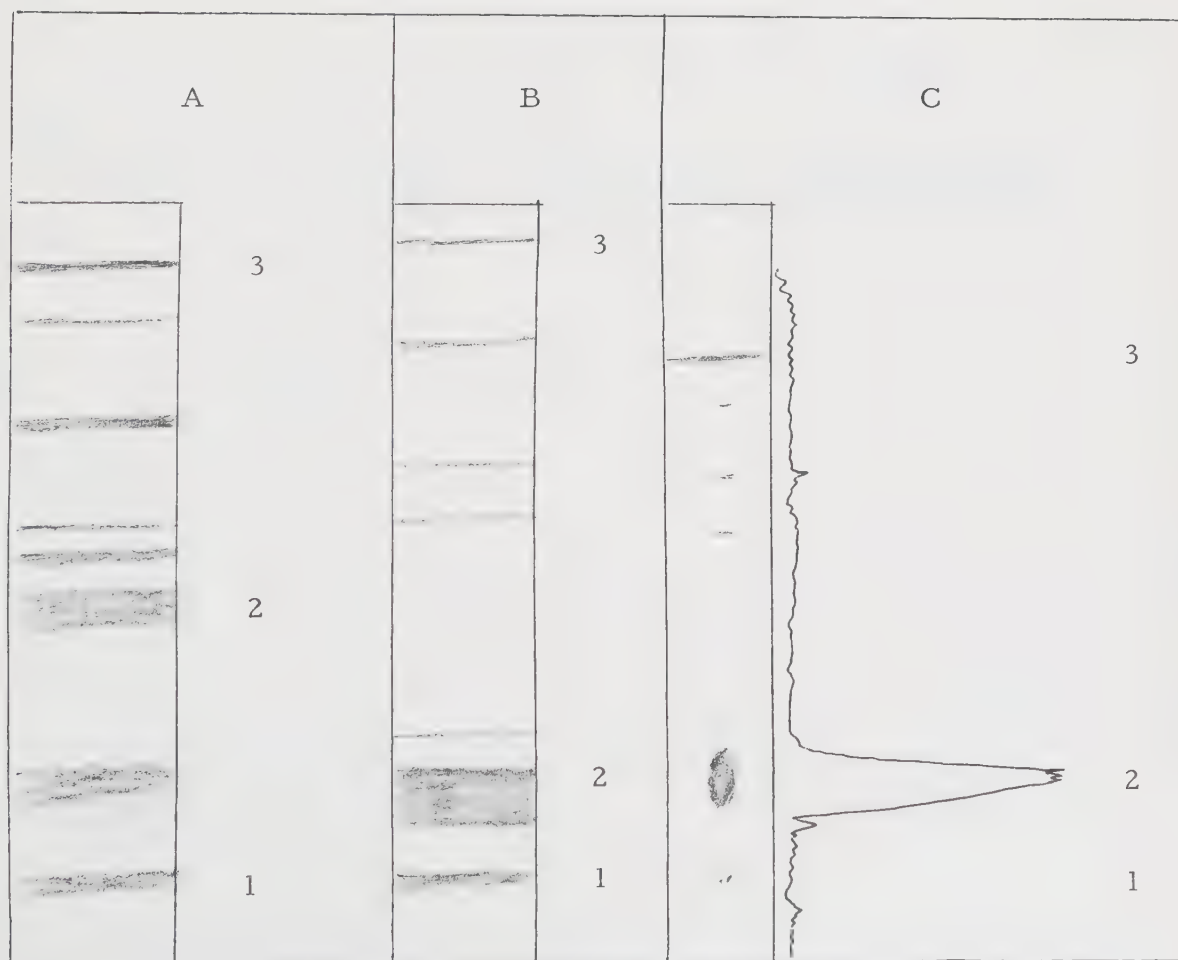
Le cholestérol extrait de ces tranches de foie est purifié par double chromatographie en couche mince (la composition des systèmes de développement est donnée dans le tableau 8, page 57).

A - Chromatogramme de la première chromatographie, système I

B - Chromatogramme de la seconde chromatographie, système II

C - Enregistrement de la radioactivité d'un chromatogramme de la seconde chromatographie.

1 : départ - 2 : tache de cholestérol - 3 : front



Figures 4 et 5 - Enregistrements de la radioactivité de chromatogrammes en couche mince.

- 1 : point de départ
- 2 : tache de cholestérol
- 3 : front

Figure 4 - Chromatogramme, dans le système I (°), d'un mélange d'acétate de sodium-1- $^{14}\text{C}$  et de cholestérol pur inerte. L'acétate ne migre pas.

Figure 5 - Chromatogramme, dans le système VI (°), de cholestérol formé par des tranches de foie à partir d'acétate de sodium-1- $^{14}\text{C}$  et purifié par double chromatographie en couche mince. La pureté de ce cholestérol est contrôlée par une troisième chromatographie, ici dans le système VI (°)

Toute la radioactivité est située dans la tache de cholestérol.

(°) La composition des systèmes de développement des chromatogrammes est donnée dans le tableau 8, page 57.

Figure 4 - Légende ci-contre, page 64

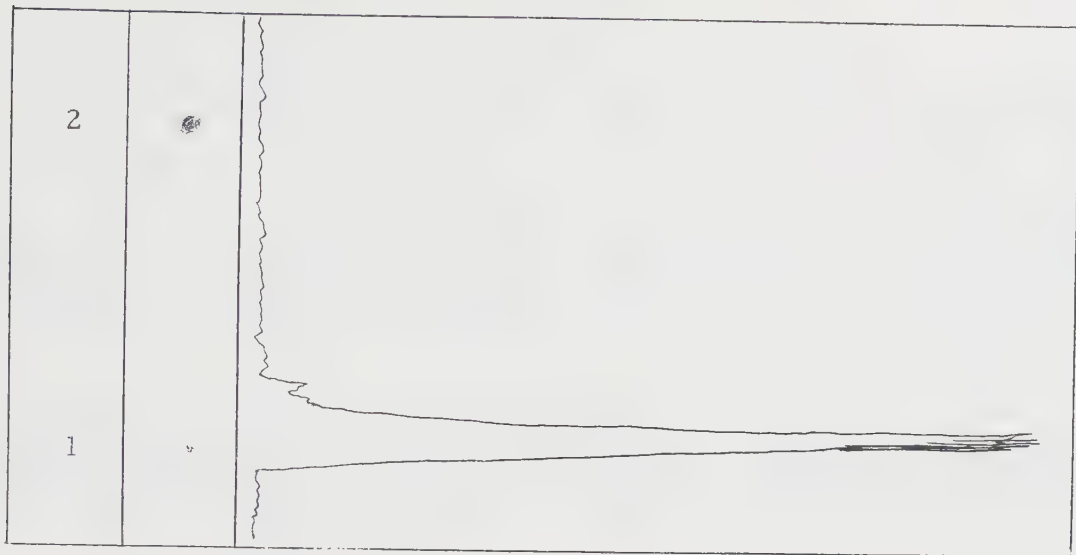
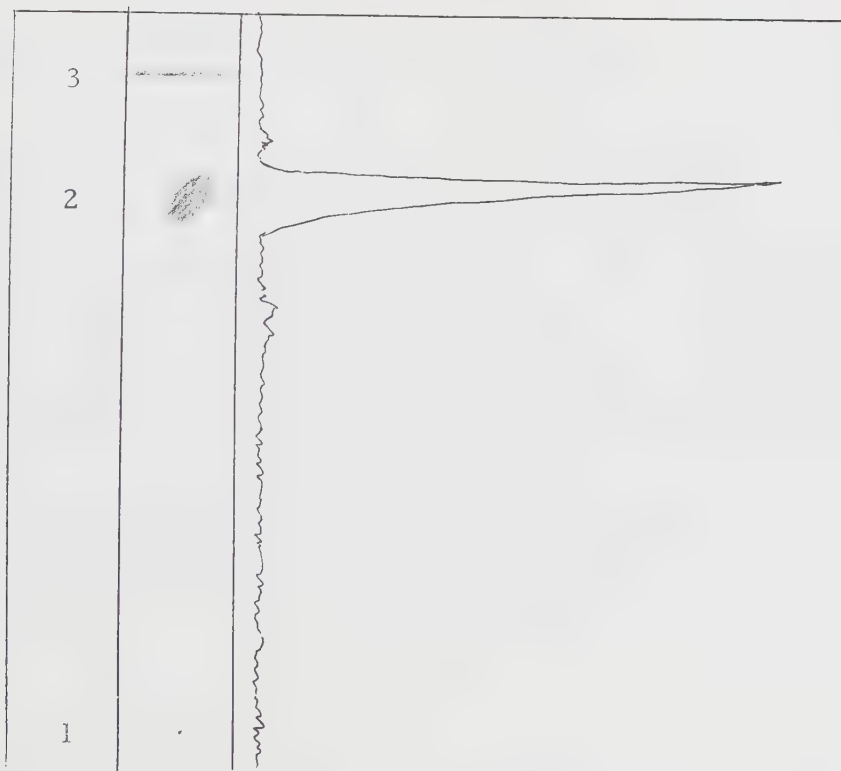


Figure 5 - Légende ci-contre, page 64



2.1.4. - Contrôle de validité de l'ensemble de la méthode :  
incubation, extraction, purification, mesures.

Nous avons effectué un contrôle global de la méthode en mettant en incubation, dans des erlens différents, des tranches provenant d'un même foie. Nous avons observé que les résultats, à partir du quatrième essai, tendaient toujours à devenir aberrants par défaut : plus le nombre d'essais par animal est important, plus croît le temps passé par le tissu hors des conditions de survie et plus est sévère la dégradation qu'il subit. Dans les conditions où nous opérons, le facteur le plus important d'irrégularité de la biosynthèse de cholestérol paraît être l'irrégularité de la durée des opérations de découpe et de mise en incubation.

Nous avons donc limité à trois le nombre d'incubations alimentées par le même foie et nous avons obtenu les activités suivantes (en cpm/mg, au compteur à fenêtre) au cours de cinq contrôles :

---

|            |   |      |   |    |        |
|------------|---|------|---|----|--------|
| contrôle 1 | : | 590  | + | 29 | cpm/mg |
| contrôle 2 | : | 225  | + | 9  |        |
| contrôle 3 | : | 1315 | + | 50 |        |
| contrôle 4 | : | 835  | + | 30 |        |
| contrôle 5 | : | 2380 | + | 40 |        |

Pour chaque contrôle, on donne la moyenne des trois activités spécifiques mesurées accompagnée de l'écart maximum observé entre les valeurs individuelles et la moyenne.

Notre méthode donne donc des résultats reproductibles à 5 % près. Comme l'incertitude due aux comptages et celle due au dosage colorimétrique sont chacune de l'ordre de 1 à 2 %, on conclut que la technique d'incubation utilisée peut donner des résultats réguliers à 2 ou 3 % près. Par mesure de sécurité, lors des expériences en série, nous avons limité le nombre d'essais par rat à un seul ; cette limitation découlait aussi de la nécessaire compression de durée de chaque analyse permettant le travail en série.

La part d'erreur revenant au comptage est estimée en prenant 2 fois l'écart quadratique moyen d'une série de comptages d'une même coupelle et en comparant les nombres d'impulsions donnés par 2 ou 3 coupelles du même cholestérol.

L'incertitude provenant du dosage est estimée à partir de la colorimétrie de nombreux échantillons de cholestérol pur.

## 2. 1. 5 - Critique de la méthode

### 2. 1. 5. 1. - Vitesse de pénétration de l'acétate dans les cellules hépatiques.

L'ensemble des contrôles que nous venons de décrire permet de prétendre que l'activité spécifique assignée finalement au cholestérol d'un incubat est identique à son activité spécifique réelle, avec une marge d'erreur connue. Il semble permettre également d'assurer que les tissus hépatiques d'animaux différents sont placés dans des conditions sensiblement identiques pour exercer leur activité cholestérogénique et que seul l'état différent de leurs systèmes enzymatiques responsables de cette activité pourra expliquer une différence dans la quantité de  $^{14}\text{C}$  incorporée dans le cholestérol.

Il est extrêmement peu probable que la vitesse de pénétration de l'acétate dans les cellules hépatiques puisse influencer sensiblement cette incorporation. Les innombrables expériences de biosynthèse des substances biologiques les plus diverses, ont montré que l'acétate est très rapidement utilisé, aussi bien chez le végétal que chez l'animal. Nous nous contenterons de citer trois de ces expériences qui concernent directement notre sujet. BLOCH (73) a étudié le taux de marquage du cholestérol produit par des tranches de foie de rat à partir d'acétate marqué au Deutérium ou au Carbone 13, en fonction de la concentration de l'acétate dans le milieu d'incubation : la quantité d'isotope lourd incorporée dans le cholestérol n'est pas modifiée lorsque la masse d'acétate marqué introduite dans le milieu passe de 10 à 150 mg dans 10 ml de tampon, pour 2 g de tissu. Si la vitesse de pénétration de l'acétate dans les cellules hépatiques limitait la vitesse d'incorporation du traceur, une telle variation de concentration aurait eu un effet sur le taux de marquage du cholestérol. CHEVALLIER (80) a mesuré l'activité spécifique du cholestérol trouvé dans les cellules de Kupfer et dans les cellules parenchymateuses du foie de rat quelques minutes après une injection intrapéritonéale d'acétate de sodium  $-1-^{14}\text{C}$  (afin de déterminer dans lequel de ces deux types de cellules est formé le cholestérol) : 2 mn après l'injection, le cholestérol n'est pas encore marqué;

à la quatrième minute, l'activité spécifique du cholestérol représente environ 25 % et, à la 5<sup>e</sup> minute, près de 50 % de l'activité maxima qui est atteinte avant la 16<sup>e</sup> minute. ECKLES (81) avait déjà obtenu des résultats semblables (maximum d'activité spécifique du cholestérol hépatique 15 mn après l'injection d'acétate radioactif dans une veine mésentérique) en mesurant l'activité spécifique du cholestérol de biopsies effectuées en différents points du foie de chien. Nous avons trouvé (Résultats, page 79) que le foie du rat exercé incorpore le  $^{14}\text{C}$  dans le cholestérol plus vite que le foie du rat non exercé. Si la marche accélère la pénétration de l'acétate dans les cellules hépatiques, le processus d'incorporation du  $^{14}\text{C}$  dans le cholestérol n'y gagne que quelques minutes sur les 180 que dure l'incubation.

2.1.5.2. - Défaut d'une mesure directe de la quantité de  $^{14}\text{C}$  incorporée par gramme de tissu.

La grandeur que nous mesurons n'est pas la quantité d'isotope lourd incorporée, c'est à dire, à un facteur près, la quantité de cholestérol produite, mais l'activité spécifique du cholestérol présent dans l'incubat au moment où cesse l'activité biologique. Or seule la première grandeur mesure l'activité cholestérogénique des tranches de foie. L'activité spécifique ne peut en être un moyen de mesure acceptable que si elle est reliée à l'activité totale par un facteur de proportionnalité identique chez les rats exercés et chez les rats non exercés.

La réponse à cette objection fait appel aux résultats précédemment acquis (Tableau 4, page 37) : chez le rat normalement nourri, le taux de cholestérol hépatique diffère peu d'un groupe de rats à l'autre ; au début de l'incubation, dans l'incubat provenant de rats exercés, la masse de cholestérol par gramme de tissu est, en moyenne, sensiblement la même que dans les incubats des rats témoins. Par ailleurs, si le cholestérol est dégradé pendant l'incubation, l'activité spécifique de ce cholestérol perdu doit être, en chaque point du tissu et à chaque instant, identique à celle du cholestérol restant, en ce point et à ce moment. La dégradation d'une partie du cholestérol pendant l'incubation ne modifie donc pas son activité spécifique.

Dans ces conditions, le facteur de proportionnalité (la masse) reliant l'activité spécifique à l'activité totale est le même pour les rats exercés et non exercés; l'activité spécifique mesurée est donc un instrument valide de comparaison des capacités cholestérogéniques des différents groupes de rats.

Cependant, il convient de corriger cette conclusion en rappelant que les rats B présentent un taux de cholestérol hépatique plus élevé de 10 à 15%, ce qui conduit, par la considération de la seule activité spécifique, à sous-estimer d'autant la capacité cholestérogénique du foie de ces rats. Lorsque les résultats seront comparés et interprétés, il sera nécessaire de faire intervenir cette correction.

Connaissant le volume total de la solution finale de cholestérol et le volume de cette solution soumis au dosage, il était, à première vue, possible de déterminer la masse et l'activité totales du cholestérol extrait de l'incubât. Mais avec quelle précision ? Nous avons soigneusement étudié le rendement en cholestérol de la chromatographie en couche mince d'extraits de foie ou de cholestérol pur. D'une dizaine d'expériences comportant chacune de 3 à 15 plaques, nous avons retenu qu'à l'élution, on retrouve plus de 90% de 1,5 mg de cholestérol pur mis sur une plaque; mais si un rendement encore satisfaisant est obtenu avec moins de 0,5 mg de cholestérol impur, avec des quantités plus fortes d'extrait hépatique, le rendement peut tomber à 65% (par ailleurs, avec une excellente reproductibilité pour le même extrait) lorsque la masse de cholestérol engagée atteint 1,5mg. Le nombre de plaques que nous pouvions préparer, utiliser, décontaminer et nettoyer chaque semaine, a réglé le nombre de plaques disponibles pour chaque extrait : ce nombre ne permettait pas de traiter moins de 0,5 mg par plaque. Ne chromatographier qu'une partie aliquote de l'extrait de foie pour obtenir des rendements élevés et réguliers, nous aurait livré des quantités de cholestérol insuffisantes pour effectuer des dosages et des comptages précis, pour parer aux pertes accidentelles et pour opérer des contrôles de pureté. De plus, pour assurer cette pureté, nous avons volontairement négligé de récupérer les bords des bandes de cholestérol radioactif sur les plaques chromatographiques. Dans ces conditions, l'estimation de l'activité totale incorporée dans le cholestérol par gramme de foie eût été grevée d'une très forte incertitude. Nous ne pouvions pas introduire dans cette expérience des résultats mal assurés qui auraient pu jeter un doute sur la valeur des mesures plus exactes de l'activité spécifique.

2.1.5.3. - Interférence du sang retenu par les tranches de foie dans l'incorporation du  $^{14}\text{C}$  et dans la détermination de l'activité spécifique du cholestérol.

La confrontation de plusieurs publications montre clairement que l'activité cholestérogénique sanguine est nulle ou, comme TAKEUCHI (82) l'a montré récemment, très faible et localisée dans les leucocytes (18 - 81 - 83 - 84). Le sang contenu par les tranches de foie ne peut donc intervenir que par le cholestérol inerte qu'il apporte : comme son taux de cholestérol (mg/ml) est inférieur à celui du foie (mg/g), il est peu vraisemblable que la quantité demeurant dans le foie des rats décapités et soigneusement vidés de leur sang, soit assez importante pour avoir beaucoup perturbé, par ses variations d'un rat à l'autre, la détermination des taux de cholestérol hépatiques. Cependant, cette question exigeait une réponse plus assurée que nous avons trouvée à l'occasion des mesures de l'activité de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase du foie (page 75) : le foie retient un volume de sang inférieur à 0,02 ml par gramme de tissu, quantité négligeable.

2.2. - MESURE DE L'ACTIVITE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE DU FOIE (EC : 1.1.1.49).

Nous avons utilisé la méthode décrite par LOEHR dans le manuel d'analyse enzymatique de BERGMEYER (69) et dont le principe est une détermination spectrophotométrique de la vitesse de formation du NADPH par une fraction d'homogénat de foie en présence d'un excès de Glucose-6-phosphate et de NADP.

2.2.1. - Protocole opératoire

Du foie rapidement retiré de l'animal, on prélève une tranche large et mince, de 300 mg environ, que l'on sèche sur papier filtre pour enlever le sang, puis que l'on pèse dans un tube à centrifuger préalablement taré et refroidi dans un bain de glace. Avec une pipette graduée, on verse dans le tube un volume exactement mesuré (environ 10 ml/200 mg de tissu) d'une solution saline physiologique froide contenant de l'EDTA ( $6,6 \cdot 10^{-4}$  M).

Le tube est alors placé dans un bain d'eau glacée et son contenu, homogénéisé pendant dix secondes avec un broyeur Ultra-Turrax : l'augmentation de température provoquée par cette opération est de l'ordre de 3°C. Pour connaître le volume de l'homogénat, nous avons attribué au foie, après plusieurs mesures, une densité moyenne de 0,965. L'homogénat est centrifugé 20 mn à 1°C et à 25 000 g. Il s'écoule 6 mn entre le moment où le foie est prélevé et celui où l'homogénat tourne à 15 000 t/mn. Les mesures spectrophotométriques sont effectuées avec un appareil Jobin-Yvon thermostaté; dans la cuve de mesure (largeur, 1 cm), on place 2,4 ml d'un tampon triéthanolamine (0,05 M; pH 7,5) contenant de l'EDTA ( $5,3 \cdot 10^{-3}$  M) 0,50 ml du surnageant de l'homogénat et 0,05 ml d'une solution de NADP ( $3 \cdot 10^{-2}$  M) dans de l'eau bicarbonatée NaHCO<sub>3</sub> 1%). Après 5 mn, on ajoute 0,05 ml d'une solution aqueuse de Glucose-6-Phosphate ( $4 \cdot 10^{-2}$  M). Les mesures de densité optique sont effectuées à la température de 30°C, à 366 mμ, contre un témoin où la solution de NADP est remplacée par un volume égal de tampon.

#### 2.2.2. - Contrôle de reproductibilité.

En traitant parallèlement deux tranches du même foie, nous avons obtenu, par minute et par gramme de tissu, les variations de densité optique suivantes :

---

| contrôle 1      | contrôle 2      | contrôle 3       |
|-----------------|-----------------|------------------|
| $3,21 \pm 0,05$ | $5,34 \pm 0,14$ | $4,35 \pm 0,025$ |

---

Pour chaque contrôle (de deux essais chacun), on donne la moyenne des deux valeurs individuelles et l'écart entre ces valeurs et la moyenne.

---

Les résultats obtenus par cette méthode semblent donc reproductibles à 3% près.

### 2.2.3. - Critique de la méthode

#### 2.2.3.1. - Extraction de l'enzyme par broyage et centrifugation

SCHMIDT (70) (71) dont les travaux ont inspiré l'essentiel du protocole expérimental, broie le tissu à l'Ultra-Turrax pendant deux minutes et centrifuge à 20.000 g. Dans ces conditions, il trouve dans le surnageant, la totalité des 14 enzymes qu'il étudie ; il a vérifié qu'un broyage d'une mn était suffisant pour obtenir ce résultat avec les moins fortement fixés aux structures cellulaires. Mais plusieurs auteurs ont signalé d'importantes pertes d'activité enzymatique causées par l'emploi, même pendant moins de deux mn, de broyeurs à rotation très rapide (71 - 85 - 86). Nous avons réduit considérablement la durée du broyage (10 secondes au lieu de 2 mn). Nous pensons qu'un broyage de 10 secondes est cependant suffisant pour faire passer toute l'activité de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase du foie dans le surnageant. En effet, KALINA (87) a montré qu'après quelques minutes d'incubation dans un tampon glycylglycine 0,1 M (pH 7,6), des tranches de foie perdent toute leur activité Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase au profit du milieu environnant. Il est donc possible d'admettre que le surnageant de nos homogénats contenait toute l'activité Glucose-6-Phosphate-Deshydrogénase de nos homogénats.

#### 2.2.3.2. - Interférence de la 6-Phosphogluconique-Deshydrogénase (EC : 1.1.1.44) dans les déterminations spectrophotométriques.

Cet enzyme passe très facilement dans le surnageant de l'homogénat (87). Dans les conditions normales, il est plus actif que la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase (88) ; dans les conditions de l'expérience, alimenté en substrat par la glucose-6-phosphate-Deshydrogénase, placé en présence d'un excès de son Coenzyme, il doit produire des quantités non négligeables de NADPH (89). Ce n'est pas un inconvénient puisque nous cherchons à mesurer, en fait, non pas l'activité de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase mais la production de NADPH par le cycle des pentoses dans le foie (page 50).

2.2.3.3. - Interférence, dans les déterminations spectrophotométriques, des oxydoréductases acceptant NADPH comme donneur d'hydrogène (EC : oxydoréductases du groupe 1.6.)

Les oxydoréductases qui acceptent NADPH comme donneur d'hydrogène doivent, par leur action, fausser les mesures. Quelle est l'importance de l'erreur dont ces enzymes sont responsables ? Dans notre protocole opératoire, nous avons omis de prévoir une cuve témoin contenant du NADPH à la place de NADP. Il nous est donc impossible d'estimer exactement la perte de NADPH due à l'activité des oxydoréductases.

Il n'est pas certain, cependant, que nos résultats en soient invalidés. SCHMIDT (70) dit avoir vérifié que l'intervention des enzymes parasites est négligeable, dans les conditions où l'on opère (gros excès de substrat et de coenzyme pour l'enzyme étudié). NARAHARA (90) a étudié l'interférence des oxydoréductases consommatrices de NADPH sur le dosage du Glucose-6-phosphate; il a montré qu'elle est due essentiellement à la Glutathion-Réductase (EC : 1.6.4.2.) : on peut supprimer la perte de NADPH en ajoutant au milieu du chlorure mercurique et du Glutathion réduit. Si l'enzyme parasite est présent en faible quantité (comme dans une préparation purifiée de Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase), son intervention n'est pas immédiate (STEINER (91) a fait la même observation). Si la Glutathion-réductase est présente en quantités importantes ou se trouve abondamment pourvue en substrat, comme c'est le cas dans un extrait de foie normal, l'accroissement de densité optique dû à la production de NADPH s'affaiblit très rapidement et s'annule dès la 5e minute. Si on ajoute au milieu du Glutathion réduit et du chlorure mercurique, l'accroissement de densité optique peut être représenté, en fonction du temps, par une droite. Les courbes de densité optique en fonction du temps que nous avons obtenues sont de ce dernier type (figure 6, page 77) : elles montrent une progression très régulière de la quantité de NADPH présente dans la cuve, pendant plusieurs minutes (de 10 à 20 mn). Ensuite cette progression faiblit mais nous ne l'avons jamais vu s'annuler avant 26 mn. Pour nos déterminations d'activité enzymatique, nous avons fondé nos calculs sur la partie rectiligne de ces courbes; d'après les observations de NARAHARA et de STEINER, on peut penser que, dans les foies que nous avons étudiés, l'activité de la Glutathion-réductase était faible.

Il semble donc que nos mesures n'ont pas été faussées par l'action de cet enzyme dont le défaut d'activité, dans le foie de nos rats, est peut-être dû au jeûne de 24 h. que ceux-ci ont subi (plusieurs auteurs ont signalé une baisse de taux de glutathion réduit ou oxydé dans le foie d'animaux à jeûn) (92 - 93 - 94).

#### 2.2.3.4. - Intervention du sang retenu par le foie analysé.

Dans le sang, les leucocytes présentent une très forte activité Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase ; les erythrocytes montrent une activité beaucoup plus faible. Mais la disparité du nombre de ces éléments figurés par  $\text{mm}^3$  (de 9 à 18.000 leucocytes contre 7 à 10 millions de globules rouges, chez le rat adulte) explique que seuls les erythrocytes sont susceptibles d'intervenir notablement dans les mesures d'activité Glucose-6-phosphate du foie.

Avant d'entreprendre ces mesures, nous avons déterminé le volume de sang retenu par un foie de rat décapité et l'activité Glucose-6-phosphate des erythrocytes de sang veineux. Nous avons trouvé (page 76) que le sang retenu par le foie ne pouvait avoir qu'une influence négligeable dans les déterminations d'activité de l'enzyme étudié dans le foie.

### 2.3. - DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE DES ERYTHROCYTES DE SANG VEINEUX. ESTIMATION DU VOLUME DE SANG RETENU PAR LE FOIE D'UN RAT DECAPITE (par comparaison des taux de fer du sang et du foie)

#### 2.3.1. - Dosage du fer dans le sang et le foie.

Nous avons utilisé, avec quelques modifications, la technique décrite par LECOQ (95) pour le dosage chimique de l'hémoglobine dans le sang.

---

Errata : ci-dessus, paragraphe 2.2.3.4., 7e et 9e lignes, au lieu de "activité glucose-6-phosphate", lire "activité de la glucose-6-phosphate-Deshydrogénase".

Le sang du rat est reçu dans un bécher; à l'aide d'une seringue préalablement rincée avec une solution de citrate de sodium 4%, on en prélève rapidement un ml que l'on mélange à 4 ml d'eau. Le foie est découpé, pesé, broyé avec un appareil Ultra-Turrax. On minéralise le fer d'un ml de sang dilué ou de 2 ml de bouillie de foie par l'acide sulfurique, le sulfate d'ammonium et l'acide trichloracétique. Le liquide surnageant, après centrifugation 5 mn à 3 000 t/mn, contient le fer sanguin ou hépatique. On traite une partie aliquote du surnageant par le thiocyanate d'ammonium et on lit la densité optique au photolorimètre Meunier à 560 m $\mu$ . L'étalonnage de l'appareil est effectué à l'aide d'une solution acide d'alun de fer et d'ammonium. Des contrôles de reproductibilité effectués avec de nombreuses prises du même sang ou du même foie, ont montré que les résultats étaient réguliers à 2,2% près pour les deux dosages.

2.3.2. - Estimation approximative du volume de sang retenu par le foie d'un rat décapité.

Dans un foie de rat, nous avons découpé des lamelles minces; les unes ont été essuyées soigneusement sur papier filtre, les autres non. Le fer de ces lamelles a ensuite été dosé. La perte de fer obtenue par essuyage soigneux représentait moins de 5% du fer hépatique. Nous avons donc admis que le sang restant dans un foie de rat décapité apporte au plus 10% du fer trouvé dans ce foie (le reste du fer hépatique étant celui de la ferritine ou de l'hémosidérine stockés dans le foie, ou de composés tels que la Bilirubine). Les résultats (tableau 14, page 83) du dosage du fer sanguin décrit plus haut montrent alors que un gramme de foie contient au plus 0,017 ml de sang. Dans des biopsies de foie humain, SCHMIDT (71) trouve que le sang représente 1,7% du poids du tissu, soit sensiblement 0,017 ml par gramme.

2.3.3. - Détermination de l'activité de la Glucose-6-Phosphate-Deshydrogénase des erythrocytes de sang veineux.

Le sang veineux est pris dans le sinus rétroorbital, après anesthésie de l'animal à l'éther, selon la technique de HALPERN décrite par STONE (96). SCHWEIZER (97) a montré que l'anesthésie à l'éther ne modifie ni l'hématocrite ni le degré de saturation en oxygène du sang humain.

Selon RUDNEV (98), ce type d'anesthésie a très peu d'influence sur les taux de Glutathion oxydé ou réduit du sang.

Nous avons effectué ces mesures avec le sang de 7 rats de 340 g environ (2 rats T, 3 rats A, 2 rats B) sans trouver d'écarts significatifs entre les activités de la Glucose-6-phosphate-Déshydrogénase erythrocytaire des différents groupes de rats. L'activité moyenne, exprimée en unités de densité optique par minute et par ml de sang est de 2,10 (valeur nettement inférieure à celle que nous avons trouvée pour 1 g de foie) (tableau 14, page 83). Un rapide calcul montre que les hématies restées dans le foie de nos rats peuvent, dans les pires conditions, être responsables de 1 % de l'activité Glucose-6-phosphate-Déshydrogénase trouvée dans le foie (5 %, dans les biopsies de foie humain, selon SCHMIDT (71) ).

Cette détermination d'activité enzymatique dans le sang se prête aux mêmes critiques que l'expérience similaire réalisée pour le foie (page 72 et suivantes). Cependant, l'interférence de la Glutathion-réductase semble ici moins à craindre : selon RALL (89), son activité est beaucoup moins grande dans les éléments figurés du sang que dans le foie.

---

Figure 6 - Courbe de production de NADPH par un extrait de foie, en fonction du temps : densité optique mesurée au spectrophotomètre en fonction du temps.

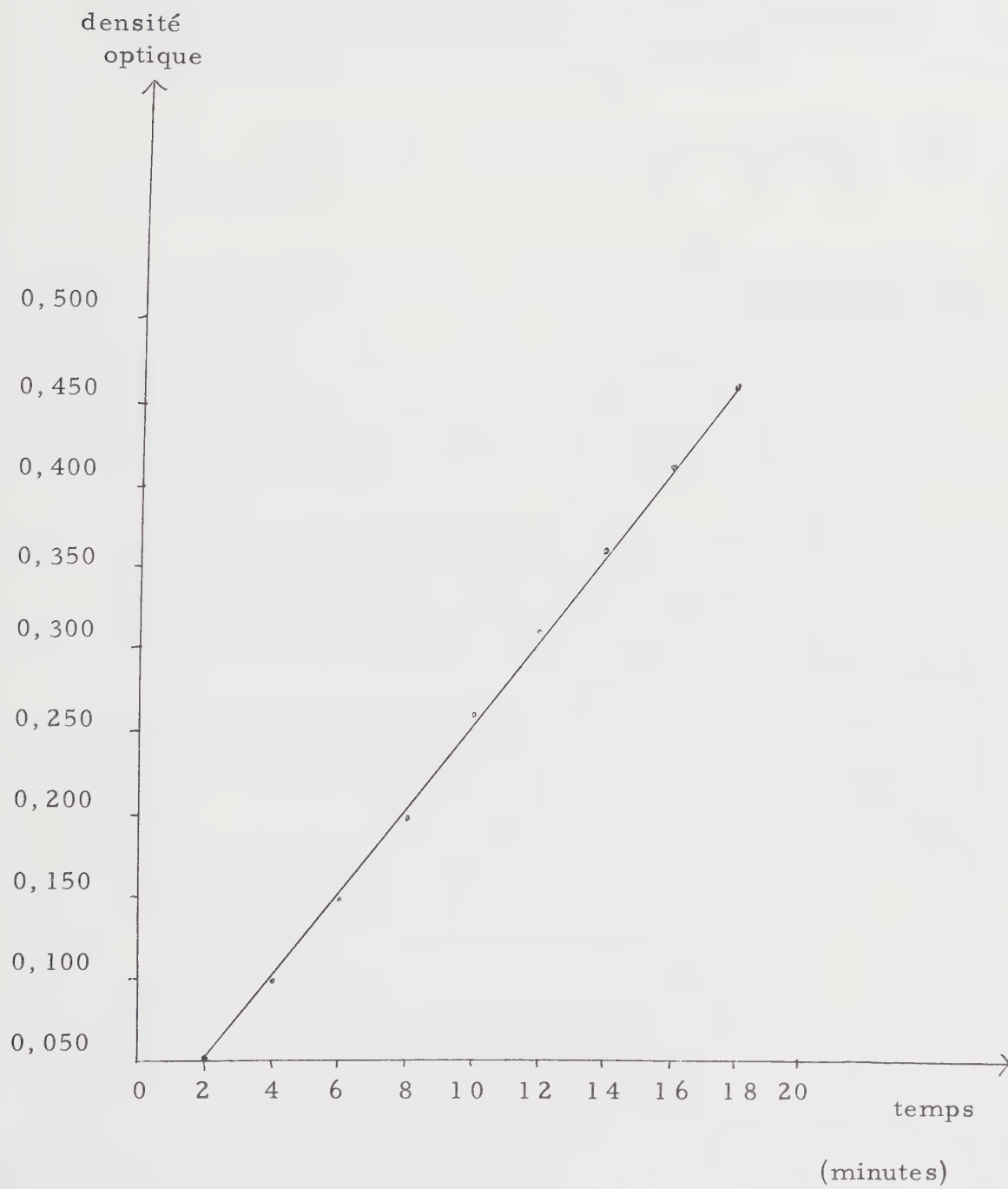
Spectrophotomètre Jobin-Yvon. - Longueur d'onde : 366 m $\mu$  ; température : 30° C. Cuve de 1 cm. Volume de solution : 3 ml  
Solution : Tampon triéthanolamine (0,05 M, pH 7,5 ; EDTA 5,3.10<sup>-3</sup> M), 2,40 ml ; surnageant à 25.000 g d'un foie homogénéisé en solution saline (10 ml/200 mg tissu) pendant 10 s avec un broyeur Ultraturrax, 0,50 ml ; NADP (3.10<sup>-2</sup> M en NaHCO<sub>3</sub> 1 %), 0,05 ml ; Glucose-6-phosphate (4.10<sup>-2</sup> M), 0,05 ml.

L'extinction est mesurée toutes les 2 mn contre un témoin où le NADP est remplacé par 0,05 ml de tampon.

En ordonnées : densité optique. En abscisses : temps en minutes.

La courbe présentée a été obtenue avec le foie d'un rat B (exercé, sacrifié juste après une marche de 2 h.) de la série 12. Le volume de surnageant d'homogénat présent dans la cuve contient les enzymes solubles (dans les conditions de l'expérience) de 7,60 mg de foie.

Figure 6 - Légende ci-contre, page 76





3 -

R E S U L T A T S

3. 1. - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LA VITESSE D'INCORPORATION D'ACETATE DE SODIUM -1-<sup>14</sup>C DANS LE CHOLESTEROL PAR DES TRANCHES DE FOIE DE RAT. (44) (Tableau 13, page 81)

Le foie de rat exercé synthétise, " in vitro ", en tampon phosphate, un cholestérol plus radioactif que celui produit par le foie du rat non exercé.

Le cholestérol produit par le foie du rat B, sacrifié immédiatement après l'exercice, est plus radioactif que le cholestérol produit par le foie du rat A, exercé, sacrifié après un repos de 24 h. Nous rappelons que le foie des rats B présente un taux préincubatoire de cholestérol de 10 à 15% supérieur à celui du foie des rats A ou T (non exercés). La capacité d'incorporer l'acétate dans le cholestérol est donc plus forte chez le rat B que ne le laisse voir l'activité spécifique du cholestérol des incubats (cf. page 69)

3. 2. - INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LE TAUX DE FER DANS LE SANG ET LE FOIE ET SUR LA VITESSE DE FORMATION DE NADPH PAR UN EXTRAIT DE FOIE, EN PRESENCE DE GLUCOSE-6-PHOSPHATE ET DE NADP. (Tableau 14, page 83)

Nous avons trouvé chez tous les rats le même taux de fer dans le sang comme dans le foie et la même capacité hépatique de produire du NADPH en présence d'un excès de Glucose-6-phosphate et de NADP.

Tableau 13 - Activité spécifique du cholestérol - U -  $^{14}\text{C}$  extrait de tranches de foie incubées pendant 3 h. avec de l'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$  dans un tampon phosphate 0,01 M.

Après extraction, le cholestérol est purifié par double chromatographie en couche mince et mis en solution chloroformique dont une partie aliquote est dosée colorimétriquement et dont une autre partie sert aux comptages de radioactivité dans un compteur Geiger à fenêtre, après évaporation du solvant sous une lampe à lumière I.R.

- ( a ) Numéro de la série de rats.
- ( b ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( c ) Activité spécifique (mC/mM) de l'acétate de sodium -  $^{14}\text{C}$  introduit dans le milieu d'incubation.
- ( d ) Activité spécifique du cholestérol (cpm/mg) extrait des tranches de foie de rats T (non exercés) ou A (exercés, sacrifiés après un repos de 24 h.) ou B (exercés, sacrifiés juste après une marche de 2 h.) . Cette activité spécifique est également exprimée, pour chaque groupe d'une même série, en pour-cent de la valeur trouvée pour les rats T de cette série. En cpm/mg, on donne la moyenne des valeurs individuelles mesurées accompagnée (si le groupe comprend au moins 5 rats) de l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) ; lorsque cela est nécessaire, cet écart est donné, entre parenthèses, pour  $P < 0,01$ .

Les activités spécifiques de l'acétate précurseur et du cholestérol ne sont pas exprimées dans le même système d'unités. L'activité spécifique indiquée pour l'acétate est une valeur théorique calculée à partir de l'activité spécifique déclarée par le fournisseur (C.E.A.). L'activité spécifique du cholestérol est une valeur expérimentale exprimée en nombre de coups comptés par notre appareil. Un mC, dans notre appareil, donne environ  $50 \cdot 10^6$  cpm.

- ( \* ) ( \*\* ) Ecart significatif avec une probabilité de 95 % ( \* ) ou de 99 % ( \*\* ) entre la valeur donnée pour les rats A ou B et la valeur donnée pour les rats T.

Tableau 13 - Légende ci-contre, page 80

| (a)<br>série | (b)<br>nombre | (c)<br>Act. spécif.<br>Acétate<br>(mC/mM) | (d)<br>Activité spécifique du cholestérol<br>(cpm/mg) |                            |                                                           |
|--------------|---------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------|
|              |               |                                           | rats T                                                | rats A                     | rats B                                                    |
| 8            | 6             | 0,324                                     | 1 000<br>100%                                         | 1 735<br>173%              | 1 275<br>127%                                             |
| 9            | 6             | 0,162                                     | 270<br>100%                                           | 650<br>240%                | 910<br>337%                                               |
| 10           | 18            | 0,080                                     | $150 \pm 35$<br>( $\pm 58$ )<br>100%                  | $245 \pm 106$<br>163%      | $345 \pm 117$<br>( $\pm 177$ )<br>230% ( <del>111</del> ) |
| 11           | 24            | 0,340                                     | $1190 \pm 280$<br>( $\pm 420$ )<br>100%               | $1690 \pm 265$<br>142% (*) | $2450 \pm 530$<br>( $\pm 790$ )<br>206% (**)              |

Tableau 14 - Influence de la marche sur le taux de fer dans le foie, de fer et d'hémoglobine dans le sang et sur la vitesse de formation de NADPH par un extrait de foie en présence de Glucose-6-phosphate et de NADP.

On compare les résultats obtenus avec les rats T non exercés aux résultats obtenus avec les rats A (exercés, sacrifiés après un repos de 24 h.) ou les rats B (exercés, sacrifiés juste après une marche de 2 h.).

- ( a ) Numéro de la série.
- ( b ) Nombre de rats dans chaque série.
- ( c ) Mesure effectuée : mesure spectrophotométrique de la vitesse de formation de NADPH, à 30° C, en présence de NADP et de Glucose-6-phosphate, par le surnageant à 25.000 g d'un foie homogénéisé pendant 10 s avec un broyeur Ultra-Turrax - Dosage chimique du fer ou de l'hémoglobine du sang : le dosage est unique mais les résultats sont exprimés soit en taux de fer soit en taux d'hémoglobine.

- Dosage chimique du fer hépatique.
- ( d ) Vitesse de formation de NADPH en unités d'extinction du spectrophotomètre par mn et par g de tissu.  
Taux de fer du sang en  $\mu\text{g/ml}$  et du foie, en  $\mu\text{g}$  par g de tissu frais.  
Taux d'hémoglobine du sang en g/100 ml ; on admet que le fer du sang appartient dans sa totalité à l'hémoglobine. Celle-ci contient 0,33 % de fer (en masse).

On donne, pour chaque groupe d'une même série, la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ). Le taux d'hémoglobine, déduit par calcul du taux de fer sanguin, est donné sans indication d'erreur.

- ( \* ) Taux moyen d'hémoglobine dans le sang du rat adulte : environ 15 - 16 g/100 ml.
- ( ° ) La valeur donnée ici en unités d'extinction du spectrophotomètre, correspond, après correction pour la température, à environ 5.000 unités Wroblewski (69).

Tableau 14 - Légende ci-contre, page 80

| (a)<br>série | (b)<br>nbre | (c)<br>mesure<br>effectuée                                                      | (d)                                                                   |                      |                      |
|--------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|              |             |                                                                                 | Vitesse de formation de NADPH ou<br>taux de fer ou taux d'hémoglobine |                      |                      |
|              |             |                                                                                 | rats T                                                                | rats A               | rats B               |
| 12           | 37          | vitesse de for-<br>mation de<br>NADPH<br>(extinction<br>par mn, par g<br>tissu) | $3,8 \pm 0,5$<br>(°)                                                  | $3,7 \pm 0,5$<br>(°) | $3,8 \pm 0,5$<br>(°) |
| 13           | 24          | taux de fer<br>du sang<br>( $\mu\text{g/ml}$ )                                  | $470 \pm 22$                                                          | $485 \pm 14$         | $490 \pm 13$         |
|              |             | taux d'hémoglo-<br>bine du sang<br>(g/100ml)                                    | 14,1 (★)                                                              | 14,5 (★)             | 14,7 (★)             |
|              |             | taux de fer du<br>foie<br>( $\mu\text{g/g}$ tissu)                              | $75 \pm 12$                                                           | $85 \pm 11$          | $86 \pm 15$          |

## DISCUSSION DES RESULTATS

La plus forte activité spécifique du cholestérol produit "in vitro" par le foie des rats exercés (Tableau 13, page 81) n'est pas explicable par une accélération de la vitesse de pénétration de l'acétate radioactif dans les cellules hépatiques (page 67). Il semble donc que l'exercice provoque une accélération de la cholestérogénèse hépatique. Peu après la première publication des résultats justifiant cette conclusion (44), nous avons eu connaissance des travaux de ALEKSANDROW (35) dont les résultats, obtenus par une expérimentation "in vivo", concordaient avec les nôtres.

ALEKSANDROW a opéré dans des conditions extrêmement voisines de celles que nous avons choisies : ses rats, au nombre de 16 (deux groupes de 8), de même souche et de même sexe, nourris "ad libitum" avec un régime semblable, sont exercés à la marche à peu près au même rythme que les nôtres pendant 5 semaines ; toutefois, ses animaux ont accès à leur nourriture jusqu'au moment du sacrifice (tandis que les nôtres sont sacrifiés à jeûn) ; ils reçoivent, 4 h. avant le sacrifice, en injection intrapéritonéale, une dose de 100 mg d'acétate radioactif (40  $\mu$ C) ; cette injection est faite, sur les rats exercés, juste après une dernière marche. Les rats exercés d'ALEKSANDROW correspondent ainsi à nos rats B et ses témoins, à nos rats T. ALEKSANDROW mesure l'activité totale trouvée dans le cholestérol hépatique (cpm/g de tissu) :

|                    |        |
|--------------------|--------|
| - rats exercés     | : 1321 |
| - rats non exercés | : 820  |

L'écart de 61 % (de la valeur donnée pour les rats non exercés) entre ces deux valeurs est significatif ( $P < 0,05$ ). Il n'est pas explicable par une accélération de la vitesse de pénétration de l'acétate dans les cellules hépatiques (page 67) (80 - 81).

Notre hypothèse (page 45) d'une activation de la cholestérogénèse hépatique par l'exercice, apparaît donc désormais très solidement fondée.

Par là même, le second volet de notre hypothèse (activation du catabolisme du cholestérol), se trouve également confirmé. En effet, l'accroissement de biosynthèse n'entraîne, chez le rat normalement nourri, aucune modification significative du taux de cholestérol sérique ou de la masse de cholestérol hépatique; nos résultats concordent sur ce fait avec ceux d'ALEKSANDROW (35) (Tableaux 4, 5, 6 pages 37, 39, 41).

Nous en avons trouvé, dans une publication russe de 1962, tardivement venue à notre connaissance, une confirmation supplémentaire que nous proposons cependant avec circonspection car l'exercice y est la nage et la méthode employée, moins probante, à notre avis, que les méthodes radiochimiques : POPOVA (36), comparant les taux de cholestérol trouvés dans le foie, avant et après incubation en tampon acétate ou en tampon phosphate, observe, chez le rat entraîné, un catabolisme hépatique du cholestérol plus actif que chez le rat non entraîné.

Cette influence du travail sur le métabolisme hépatique du cholestérol est peut-être indépendante de la vitesse de formation du NADPH dans le cycle des pentoses. D'une part, nous avons observé (tableau 13, page 81) que des tranches de foie de rats exercés, dans un tampon phosphate 0,01 M, incorporent l'acétate radioactif dans le cholestérol plus rapidement que les tranches de foie de rats non exercés; or le phosphate est un inhibiteur de la Glucose-6-phosphate-Deshydrogénase dont il annule l'activité à la concentration de 0,1 M (69). D'autre part, des extraits d'homogénats de foie de rats exercés et de rats non exercés, en présence d'un excès de NADP et de Glucose-6-phosphate, produisent du NADPH à la même vitesse (tableau 14, page 83). La réalité de ce dernier fait peut être contestée (page 73) : l'action des transhydrogénases, en particulier de la Glutathion-réductase, pourrait avoir faussé les mesures. Toutefois, l'hypothèse d'une telle interférence semble infirmée par l'aspect des courbes obtenues, après confrontation de ces courbes avec les données de la littérature sur l'interférence des transhydrogénases dans ce dosage spectrophotométrique (figure 6, page 77) (page 73).



CHAPITRE TROISIÈME

---

INFLUENCE DE LA MARCHE SUR LA REPARTITION PONDERALE  
DU CHOLESTEROL ET DES ACIDES BILIAIRES DANS LA BILE.



1 -

## I N T R O D U C T I O N

Les plus nets indices d'une action de l'exercice sur le catabolisme du cholestérol concernent le foie : cholestérogénèse accélérée sans accumulation de cholestérol chez le rat normalement nourri, baisse importante des réserves de cholestérol chez le rat engraissé au saindoux. De plus, c'est bien dans le foie que la dégradation du cholestérol, par la formation d'acides biliaires, prend, quantitativement le plus d'importance (99).

Nous avons donc consacré la suite de nos travaux à l'étude des effets du travail sur la production des acides biliaires et, accessoirement, sur l'excrétion biliaire du cholestérol. Nous avons d'abord essayé d'utiliser une technique radiochimique permettant de mesurer la vitesse de formation " in vitro " des acides biliaires. Comme substrat radioactif, nous avons choisi l'acétate de sodium, en écartant le cholestérol : toutes les tentatives antérieures de conversion " in vitro " de cholestérol radioactif en acides biliaires avaient échoué (100-101). Mais nous avons trouvé dans l'acétate fourni par la C. E. A. une impureté radioactive (0,3 pour mille de l'activité) que nous ne sommes pas parvenus à séparer des acides biliaires par des procédés simples.

La méthode que nous avons finalement retenue utilise l'animal vivant : la bile est recueillie pendant un temps déterminé et analysée selon deux techniques différentes. Nous avons trouvé, entre autres résultats, que la marche provoquait un enrichissement de la bile en acide chénodesoxycholique sans augmenter le débit global des acides biliaires dans le canal cholédoque. Ces faits confirmaient notre hypothèse d'une accélération du catabolisme du cholestérol si la vitesse de renouvellement de l'acide chénodesoxycholique était supérieure à la vitesse de renouvellement des autres acides biliaires; dans le cas contraire, notre hypothèse se trouvait infirmée.

Nous avons donc effectué une expérience complémentaire pour comparer les vitesses de renouvellement des deux principaux acides de la bile de rat, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, produits à partir du cholestérol par des voies différentes (figure 1 D, page 9). Le principe de l'expérimentation est d'injecter de l'acétate radioactif à un rat dont on recueille la bile par un catheter placé sur le cholédoque. Seules peuvent être radioactives les molécules d'acides biliaires nouvellement formées : les molécules revenant de l'intestin sont inertes. Si un acide est plus vite renouvelé que les autres, ses molécules nouvellement formées sont moins diluées par les molécules inertes et son activité spécifique dans la bile doit être plus forte.

2 -

## T E C H N I Q U E S

### 2. 1. - P R E L E V E M E N T D E B I L E

Les animaux, à jeû<sup>n</sup> depuis 24 h. , sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Nembutal (Méthyl-Butyl-éthyl-barbiturate de sodium 6, 5%; 0, 05 ml / 100 g de poids vif). VANLERENBERGHE (102) n'a trouvé aucune modification qualitative ou quantitative de la sécrétion de bile par le foie de rat anesthésié au Méthyl-butyl-éthyl-barbiturate. Le catheter de polyéthylène (calibre P 10, fournisseur RUA) est branché sur le canal cholédoque et la bile est reçue dans une pipette graduée capillaire placée en position horizontale près du rat, selon une technique classique enseignée par les manuels de physiologie pratique. Le prélèvement de bile est poursuivi pendant 2 h. Il est toujours effectué entre 7 h. 30 et 12 h. 30 (sauf, pour contrôle, avec deux rats de la série 16). CHEVALLIER (45) a montré qu'à ce moment de la journée se situe le plus long plateau de la courbe de production des acides biliaires en fonction de l'heure chez les rats laissés libres de se nourrir quand il leur plaît (c'est à dire la nuit); c'est, il faut le noter, le moment de plus faible production. La bile débitée en 2 h. (1, 5 à 2 ml) est hydrolysée au bain-marie bouillant pendant 6 h. , par 50 ml de potasse aqueuse 2 N (103). Les acides biliaires et le cholestérol en sont extraits par l'éther.

2.2. - EXTRACTION, PURIFICATION ET DOSAGE COLORIMETRIQUE DU CHOLESTEROL, DE L'ACIDE CHENODESOXYCHOLIQUE ET DE L'ACIDE CHOLIQUE. - Série 14.

2.2.1. - Extraction et dosage du cholestérol.

De la solution potassique de bile, on extrait en premier lieu le cholestérol, par quatre fois 70 ml d'éther ; le ballon où a eu lieu l'hydrolyse a été rincé trois fois avec en tout 30 ml d'eau qui ont porté à 80 ml le volume de la phase aqueuse et, par trois fois avec, en tout, 70 ml d'éther qui servent à la première extraction. La solution étherée de cholestérol biliaire est traitée comme celle de cholestérol hépatique (page 19) à cette exception près qu'elle n'est pas séchée sur sulfate de soude mais immédiatement évaporée au bain-marie à 65° C sous pression réduite ; l'eau résiduelle est additionnée d'environ 30 ml d'éthanol absolu et l'ensemble est évaporé à sec dans les mêmes conditions. Ce mode de séchage nous a paru devoir éviter la partie des pertes en cholestérol imputable au séchage par sulfate de sodium. La technique de dosage du cholestérol a été décrite ailleurs (page 21).

2.2.2. - Extraction et purification des acides biliaires.

La première eau de lavage de la solution étherée de cholestérol a été jointe à la phase aqueuse alcaline que l'on amène à pH 1 par HCl. On en extrait les acides biliaires par 4 fois 70 ml d'éther. La solution étherée est lavée à l'eau jusqu'à élimination totale des ions  $\text{Cl}^-$  (en pratique, cinq lavages sont nécessaires pour que la réaction au nitrate d'argent soit négative) ; elle est ensuite évaporée et séchée comme celle de cholestérol. Le résidu est dissous dans un volume connu d'éthanol 95° (environ 30 ml par ml de bile traité). Une partie aliquote de la solution alcoolique (1 ml) est séparée pour servir au dosage de l'acide Cholique ; une autre part (20 ml), destinée au dosage de l'acide Chénodésoxycholique, est évaporée au bain-marie à 65° C, sous pression réduite, et purifié par chromatographie sur couche mince de silicagel avec, pour phase mobile, le mélange Acétate d'éthyle-Acide acétique (96/4 vol.) (104).

Les modalités de la chromatographie (préparation, activation, révélation, élution) sont décrites ailleurs (page 53); toutefois, le dépôt de l'extrait alcoolique sur la plaque n'est pas aussi simple que le dépôt d'un extrait chloroformique : la plaque doit être refroidie jusqu'à la température du laboratoire faute de quoi la couche peut se détériorer au point d'impact des gouttes de solvant dont l'évaporation doit être activée par un courant d'air modérément chaud. L'éluant est l'éthanol 95° bouillant.

Cette chromatographie a pour but de débarrasser l'acide Chénodésoxycholique de toute trace de cholestérol; celui-ci a un Rf beaucoup plus fort que l'acide dont on peut gratter la bande largement sans risque d'entraîner du cholestérol; l'acide Desoxycholique, dont le Rf est très voisin, n'interfère pas dans le dosage. Les pertes d'acide Chénodésoxycholique ne sont donc pas abusives mais sont cependant assez fortes pour expliquer le relatif défaut de précision de la méthode en ce qui concerne cet acide.

### 2.2.3 - Dosage de l'acide Chénodésoxycholique.

Nous utilisons la technique colorimétrique d'ISAKSSON (105) légèrement modifiée : la solution alcoolique d'acide purifié, placée dans un erlen de 50 ml, est évaporée à sec à 65 °C, sous pression réduite. On dissout le résidu dans 3 ml du mélange acétate d'éthyle-acide sulfurique concentré (60/4 vol.) préparé extemporanément puis, après refroidissement, au temps pris comme zéro, on ajoute 1 ml d'anhydride acétique pur. Après 20 mn, on lit la densité optique dans un photolorimètre Meunier. Le résultat du dosage est interprété sur un graphique d'étalonnage obtenu à l'aide d'acide pur Calbiochem. Une étude, à l'électrophotomètre Beckmann, de la courbe d'absorption en fonction de la longueur d'onde, montre un pic d'absorption maximum à 670 m $\mu$  et un plateau d'absorption relativement élevée à 620-640 m $\mu$ . Nous avons effectué nos mesures à 620 m $\mu$ , précaution supplémentaire contre l'interférence du cholestérol dans le dosage. En effet, le cholestérol donne, avec les réactifs utilisés, une coloration plus forte que l'acide dosé, avec un maximum d'absorption proche de 670 m $\mu$ . Les acides Lithocholique, Désoxycholique et Hyodésoxycholique ne sont pas colorés; l'acide Cholique, coloré en rouge, n'est pas gênant. Les ions Cl<sup>-</sup> sont gênants (ils sont éliminés par lavage de la solution éthérée).

#### 2.2.4. - Dosage de l'acide Cholique

Le dosage de l'acide Cholique a été réalisé par la méthode de LAMBIOTTE (103) : la solution alcoolique d'acides biliaires est placée dans un tube rodé et évaporée à sec à 65° C, sous pression réduite. On ajoute au résidu, de l'acide acétique pur (2,5 ml), du furfural 1 % en solution aqueuse (1 ml) et de l'acide sulfurique 50 % (6 ml) ; après agitation, le tube fermé est placé pendant 45 mn au bain-marie à 65° C ; on refroidit, on ajoute 3 ml d'éthanol 95° et, après mélange, on lit la densité optique à 620 m $\mu$  au photocolorimètre Meunier. La coloration est stable dans le temps mais non dans l'espace : on dispose d'un temps assez important pour effectuer les mesures mais les tubes doivent être agités non pas juste avant la mesure (ce qui crée des bulles) mais deux ou trois minutes avant. L'acide pur utilisé pour l'étalonnage de l'appareil est un produit NBCo. La courbe d'absorption à l'electrophotomètre Beckmann révèle deux pics presque égaux d'absorption maxima à 612 et 695 m $\mu$ . Nous avons vérifié que le cholestérol et les acides Lithocholique, Désoxycholique, Chénodésoxycholique et Hyodésoxycholique ne sont pas gênants tandis que les ions Cl<sup>-</sup> le sont et doivent être éliminés (cette élimination est obtenue par le lavage de la solution étherée).

#### 2.2.5. - Contrôles de reproductibilité et de rendement en cholestérol et en acides biliaires.

Chaque contrôle comporte les opérations suivantes : la bile de plusieurs rats est mélangée puis répartie en six parts que l'on traite séparément ; dans trois de ces parts, on ajoute, avant l'hydrolyse alcaline, une masse connue d'acide Cholique et d'acide Chénodésoxycholique dissous dans KOH 2 N et, avant l'extraction à l'éther, une masse connue de cholestérol dissoute dans de l'éther. On retrouve 89 % du cholestérol, 90 % de l'acide Cholique et 88 % de l'acide Chénodésoxycholique. Les résultats sont reproductibles à 5 % près pour le cholestérol, 6 % pour l'acide Cholique et 16 % pour l'acide Chénodésoxycholique. La détermination de ce dernier souffre d'une assez grande imprécision mais le phénomène que nous avons eu à mesurer possédait des dimensions telles que cette technique peu précise s'est avérée acceptable "a posteriori".

## 2.2.6 - Critique de la méthode

Nous trouvons deux défauts à cette méthode. D'une part, elle impose des voies d'extraction, de purification ou de dosage différentes pour chacune des substances déterminées : la comparaison des masses de ces substances par ml de bile est donc entachée des incertitudes additionnées des différentes déterminations et souffre des différences de rendement. D'autre part, et ce second défaut découle du premier, le temps exigé par cette méthode croît proportionnellement au nombre de substances analysées ce qui conduit à limiter étroitement ce nombre.

## 2.3 - CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DES ACIDES BILIAIRES ET DU CHOLESTEROL DE LA BILE. - Série 15

Nous avons mis au point une méthode simple et rapide permettant l'extraction, la préparation et le dosage simultanés des substances à analyser, en modifiant les techniques que SJOVALL (106-107) et KUKSIS (108) ont utilisées pour l'analyse qualitative de la bile.

### 2.3.1 - Extraction et préparation des substances à analyser.

Le cholestérol est extrait, en même temps que les acides biliaires, par l'éther, en milieu acide, selon le protocole décrit plus haut (page 92, 2.2.2 ). L'extrait de bile sec, dissous dans 4 ml de méthanol anhydre est traité par un excès de diazométhane dans le ballon où l'évaporation de l'éther a eu lieu. Le diazométhane est préparé quelques heures avant son emploi par distillation, à l'abri de l'humidité, d'un mélange de Nitrosamide (2,14g), d'éther anhydre (30 ml) et de potasse alcoolique (0,4 g/ 10 ml éthanol 95°). Le diazométhane en solution étherée est conservé à -20°C sur des pastilles de potasse, jusqu'au moment de son utilisation (109-110).

Nous avons préparé le nitrosamide (p. tolyl-sulfonyl-méthyl-nitrosamide) par action de p. toluène-sulfochlorure sur la méthylamine en présence de soude puis par action de nitrate de soude, en milieu acétique, sur la p. tolyl-sulfonyl-méthyl-amine formée (111).

Bien que la méthylation des acides biliaires par le diazométhane soit immédiate (108), on laisse les réactifs en contact pendant une heure. On évapore ensuite l'éther et une partie du méthanol à 65° C, sous pression réduite. La solution méthanolique d'esters méthyliques est passée dans un tube à essai rodé de 20 ml à l'aide d'une pipette ; le ballon où a été opérée la méthylation est rincé trois fois avec de faibles quantités de méthanol anhydre qui sont ajoutées à la solution d'esters dans le tube. Le volume total de solution ne dépasse pas 3 ml ; le solvant est évaporé, sous pression réduite, d'abord à température ambiante puis à température croissante jusqu'à 65° C, pendant que le tube est agité d'un mouvement circulaire facilitant l'évaporation sans éclatement du liquide.

Lorsque le résidu est sec, on met dans le tube de la pyridine anhydre (une goutte), du benzène anhydre (0,6 ml) et un excès (1,0 à 1,5 ml) d'anhydride trifluoracétique pur. Il est très important, pour obtenir une trifluoracétylation correcte, de veiller à la qualité de la pyridine nécessaire à l'estérification complète de tous les hydroxyles des acides biliaires, en particulier de l'hydroxyle en 12. Le tube est fermé avec un bouchon rodé, fortement maintenu en place. La trifluoracétylation est rapide : 15 mn à 30° C selon SJOVALL, 15 mn à 45° C ou une nuit à température ambiante selon KUKSIS. Nous avons laissé reposer les tubes toute une nuit ; nous avons contrôlé qu'avec 30 mn à 45 - 50° C on obtient d'aussi bons résultats.

On évapore ensuite les réactifs, sous pression réduite, à température ambiante, puis à 65° C ; on ne parvient pas à obtenir un résidu sec : il reste un liquide d'aspect visqueux dont le volume est de  $0,1 \pm 0,05$  ml, dont l'évaporation ne peut être obtenue à 100° C sous la pression réduite donnée par une excellente pompe à palettes et dont on observe encore la formation en l'absence de toute autre substance que les réactifs de trifluoracétylation. Compte tenu de ce volume résiduel, on met dans le tube le volume d'acétone anhydre nécessaire pour amener le volume total au double du volume de bile traité. Si le tube est tenu bien clos, la solution obtenue, à température ordinaire, est stable plus de 15 jours. Nous l'avons cependant utilisée dans les trois jours suivant la préparation.

### 2.3.2. - Technique chromatographique.

La solution acétonique de trifluoracétates est analysée dans un chromatographe F et M 402. On utilise des colonnes de verre en U (long. 90 cm; diam. ext. 6 mm; diam. int. 3 mm). Le support est du Diatoport S, 80-100 mesh; la phase fixe est du QF-1, la charge de 1%. Les températures sont : colonne, 207 °C, injecteur 220°C, détecteur 260°C. Le débit de sortie du gaz vecteur (Azote R) est de 70 ml/mn, avec une pression d'entrée de 3,5 bars. Le détecteur est à ionisation de flamme à hydrogène. Le débit d'hydrogène est de 48 ml/mn (pression 3 bars), celui de l'oxygène, de 300 ml/mn (2,5 bars). L'enregistreur Honeywell a un temps de réponse de une seconde sur une largeur de papier de 27,9 cm; la vitesse de déroulement est de 18,5 cm/h. L'injection est faite, directement dans la colonne, avec une seringue Hamilton de 10  $\mu$ l dont l'aiguille a un volume intérieur de 0,5  $\mu$ l. Le volume de l'échantillon injecté est de 2,5  $\mu$ l. Un bouchon d'air d'environ 2  $\mu$ l est intercalé entre le piston de la seringue et la solution pour que soit assurée l'injection totale de la prise.

L'étalonnage de l'appareil en état de marche est effectué à l'aide de dérivés méthylés et trifluoracétylés d'acides biliaires étalons (NBCo et Calbiochem); il permet de tracer une droite donnant la masse d'acide en fonction de l'aire du pic, chaque acide étudié réclamant une droite d'étalonnage particulière (112). De plus, une injection de contrôle des dérivés étalons est effectuée chaque jour, le matin et le soir. Pendant toute la durée des opérations d'analyse chromatographique, l'appareil est maintenu en état de marche, sans aucune modification des conditions de pression ou de détection, jour et nuit.

Nos chromatogrammes comportent 8 à 9 pics (figure 7, pages 102 et 103) qui sortent tous en moins d'une heure. Nous en avons identifiés 6 (cholestérol, acide cholique, acide désoxycholique, acide chénodésoxycholique, acide hyodésoxycholique, acide lithocholique) à l'aide de nos acides étalons ou d'acides extraits par nous de la bile de rat, purifiés et identifiés par chromatographie en couche mince. Les temps de rétention relatifs des trois autres substances correspondent à ceux que SJOVALL et KUKSIS ont trouvés pour les acides 3  $\beta$  hydroxy-5  $\beta$  cholanique (épilithocholique), 3  $\beta$  12  $\alpha$  dihydroxy-5  $\beta$  cholanique (épidésoxycholique et 3  $\alpha$  hydroxy-12 céto-5  $\beta$  cholanique (céto-lithocholique) (tableau 15, page 101).

Un léger doute subsiste en ce qui concerne l'identification de l'acide hyodésoxycholique (HDC). En effet, les trifluoracétates des esters méthyliques des acides HDC et Ursodésoxycholique (UDC) ont des Rf pratiquement identiques dans notre système de chromatographie en phase gazeuse (108). Le pic que nous tenons pour celui de HDC a le même Rf que l'acide HDC fourni par NBCo, aussi bien en chromatographie en phase gazeuse qu'en chromatographie sur plaque avec les systèmes benzène-éther (8/2 vol.) sur silicagel ou silicagel à 10 % d'acide borique, pour l'ester méthylique, et toluène-acide acétique-eau (5/5/1 vol.) sur silicagel (113) ou acétate d'éthyle-acide acétique (96/4 vol.) sur silicagel (104), pour l'acide libre. Mais, ne disposant pas d'étalon d'acide UDC, nous n'avons pas pu étudier son comportement dans ces différents systèmes. Il reste cependant que l'acide HDC est seul signalé comme quantitativement important dans la bile, les fèces, le sang portal; il est douteux que l'acide UDC puisse donner des pics d'une surface comparable à celle des pics des acides désoxycholique ou chénodésoxycholique. Pour plus de sûreté, nous pouvons admettre que les résultats trouvés pour HDC concernent, en réalité, soit probablement HDC seul, soit la somme de HDC et de traces de UDC, soit, mais c'est fortement improbable, UDC seul ou quelque peu mêlé de HDC. Il semble exclu, par la forme du pic, que des masses à peu près égales des deux acides soient mêlées. Il convient enfin de noter que HDC et UDC sont tous deux dérivés de l'acide chénodésoxycholique et dérivent vraisemblablement l'un de l'autre (99) : leur confusion n'aurait aucune influence sur l'interprétation que nous avons pu faire des résultats obtenus.

### 2.3.3. - Reproductibilité et rendement.

Nous avons mis au point l'ensemble de la méthode d'extraction et de dosage, et réglé les chromatogrammes, dans le but de doser les seuls acides désoxycholique, chénodésoxycholique, hyodésoxycholique et cholique. Nous avons trouvé, en traitant séparément plusieurs prises de la même bile, que le rapport de la masse d'un de ces acides à la masse totale des quatre acides, était donnée à moins de 3 % près (pour les acides désoxycholique, chénodésoxycholique, hyodésoxycholique) ou à moins de 1 % près (pour l'acide cholique). La détermination des masses absolues souffre de l'imprécision (7 %) du volume injecté dans le chromatographe et donne les résultats à 12 % près.

Nous n'avions pas la possibilité de réduire cette imprécision en augmentant le volume injecté : le résidu des réactifs de trifluoracétylation perturbait fortement le chromatogramme lorsqu'on faisait croître la quantité injectée. L'irrégularité de l'injection ne nous a pas permis de déterminer avec précision le rendement de notre méthode : le taux de recouvrement des acides étalons ajoutés à la bile est de l'ordre de 95%.

Nous n'avions pas l'intention de doser le cholestérol ni les acides biliaires autres que les quatre précédents : les essais préliminaires nous avaient montré que l'acide lithocholique était fort peu abondant; nous n'avions pas d'étalons des autres acides et nous pensions que la faible solubilité du cholestérol dans le méthanol, en provoquerait des pertes excluant un dosage suffisamment précis. En fait, le dépouillement des chromatogrammes de contrôle et d'analyse a montré que les masses de cholestérol et d'acide cétolithocholique pouvaient être mesurées à 17 et 18% près; mais il a également révélé l'existence d'écarts assez importants pour être significatifs en dépit de l'imprécision des mesures. Nous avons donc mesuré le cholestérol et l'acide cétolithocholique par la surface de leurs pics, sans pouvoir exprimer les valeurs trouvées en unités de masse. Quant aux pics des acides épilithocholique et épidoxycholique, ils sont de peu d'importance et montrent des variations considérables d'un animal à l'autre dans le même groupe. Le pic de l'acide lithocholique est souvent inexistant, jamais mesurable.

Tableau 15 - Temps de rétention relatifs des acides biliaires et du cholestérol méthylés et trifluoracétylés, en chromatographie en phase gazeuse.

On donne le rapport du temps de rétention de chaque substance au temps de rétention de l'acide désoxycholique ( $R_{DC}$ ) ou de l'acide cholique ( $R_C$ )

|       |      |                              |           |            |                                  |
|-------|------|------------------------------|-----------|------------|----------------------------------|
| ( a ) | CST  | : cholestérol                |           |            | hydroxy-cholanique               |
|       | éLC  | : épilithocholique, acide    | $3\beta$  |            | hydroxy-cholanique               |
|       | LC   | : lithocholique, acide       | $3\alpha$ |            | dihydroxy-cholanique             |
|       | éDC  | : épidésoxycholique, acide   | $3\beta$  | $12\alpha$ | dihydroxy-cholanique             |
|       | DC   | : désoxycholique, acide      | $3\alpha$ | $12\alpha$ | dihydroxy-cholanique             |
|       | CDC  | : chénodésoxycholique, acide | $3\alpha$ | $7\alpha$  | dihydroxy-cholanique             |
|       | HDC  | : hyodésoxycholique, acide   | $3\alpha$ | $6\alpha$  | dihydroxy-cholanique             |
|       | C    | : cholique, acide            | $3\alpha$ | $7\alpha$  | $12\alpha$ trihydroxy-cholanique |
|       | céLC | : cétolithocholique, acide   | $3\alpha$ |            | hydroxy-12 céto-cholanique       |

( b ) Temps de rétention relatifs moyens trouvés au cours des expériences présentées ici (Bile de rat et acides étalons).

( c ) Temps de rétention relatifs rapportés par KUKSIS (108) et observés par KUKSIS avec des extraits de bile humaine, et, par KUKSIS et SJOVALL, avec des solutions d'acides biliaires purs.

Chromatographe F et M 402 - Support : Diatoport S 80-100 mesh  
 HMDS - phase fixe : QF - 1, 1 % - Colonnes en verre, en U : diam. int. 3 mm ; long. 90 cm - gaz vecteur : Azote R, 70 ml/mn, 3,5 bars -  
 Détection par ionisation de flamme à hydrogène - Hydrogène, 48 ml/mn, 3 bars - Oxygène, 320 ml/mn, 2,5 bars - Enregistreur Honeywell : temps de réponse, 1 s ; papier, larg. 27,9 cm, déroulement 18,5 cm/h -  
 Températures : colonne 207° C, injecteur 220° C, détecteur 260° C -  
 Injection directe dans la colonne (seringue Hamilton 10  $\mu$ l). - Volume injecté : 2,5  $\mu$ l ; pour les extraits de bile de rats non exercés, si le pic de l'acide cholique déborde du papier, l'injection est refaite avec un volume de 1,5  $\mu$ l.

Tableau 15 - Légende ci-contre, page 100.

| Substances<br>(a) | $R_{DC}$        |                    | $R_C$           |               |
|-------------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------|
|                   | série 15<br>(b) | KUKSIS<br>(c)      | série 15<br>(b) | KUKSIS<br>(c) |
| CST               | 0,324           |                    |                 |               |
| éLC               | 0,59            | 0,61               |                 |               |
| LC                | 0,65            | 0,63 - 0,69        |                 |               |
| éDC               | 0,85            | 0,81 - 0,83 - 0,86 |                 |               |
| DC                | 1,00            | 1,00               |                 |               |
| CDC               | 1,33            | 1,24 - 1,27 - 1,28 | 0,60            | 0,62          |
| HDC               | 1,58            | 1,46               | 0,71            | 0,70          |
| C                 | 2,21            | 2,01 - 2,07        | 1,00            | 1,00          |
| céLC              | 2,47            | 2,28 - 2,30        | 1,12            | 1,11 - 1,13   |

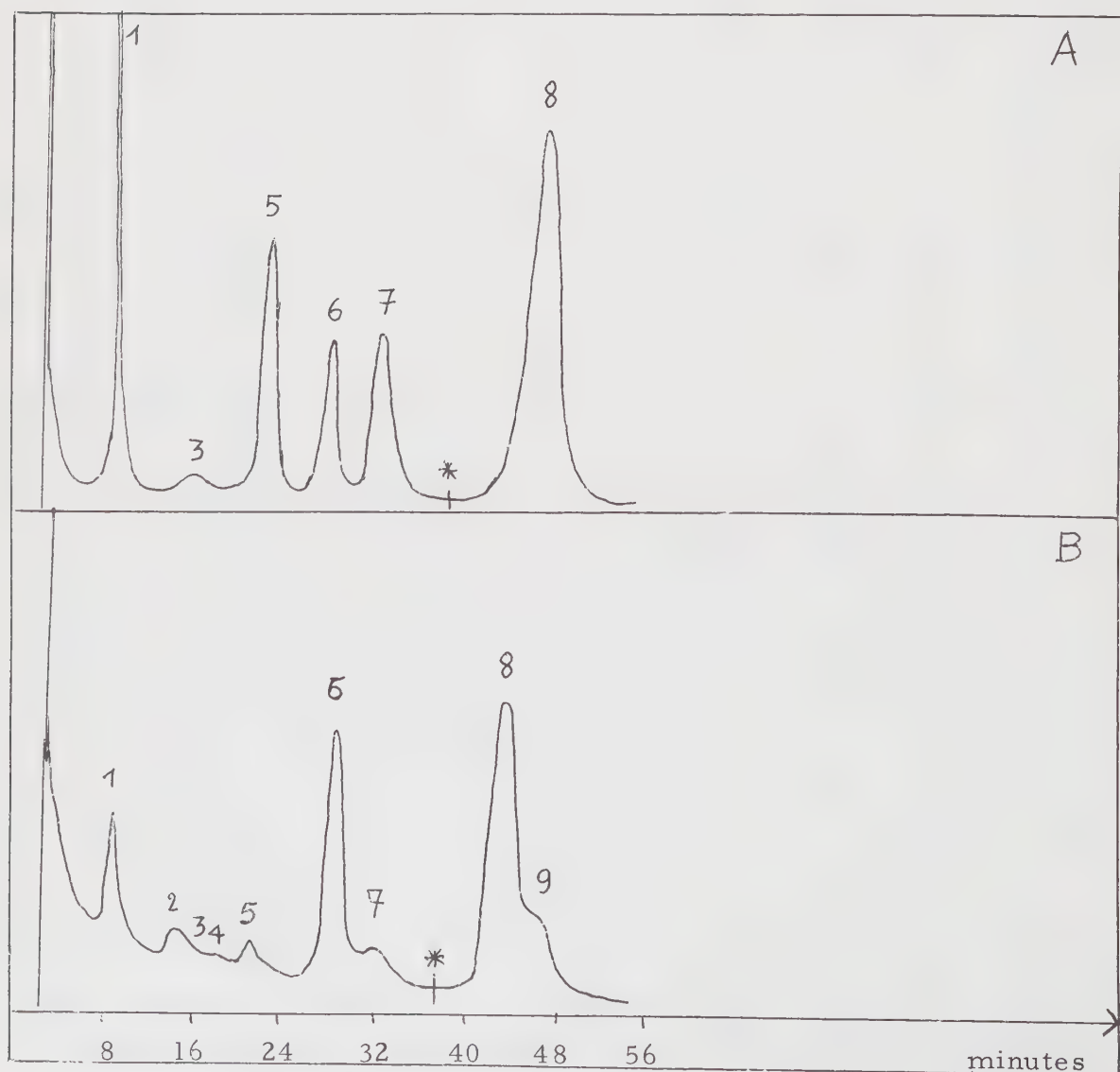
Figure 7 - Chromatogrammes (en phase gazeuse) de cholestérol, et d'acides biliaires méthylés et trifluoracétylés.

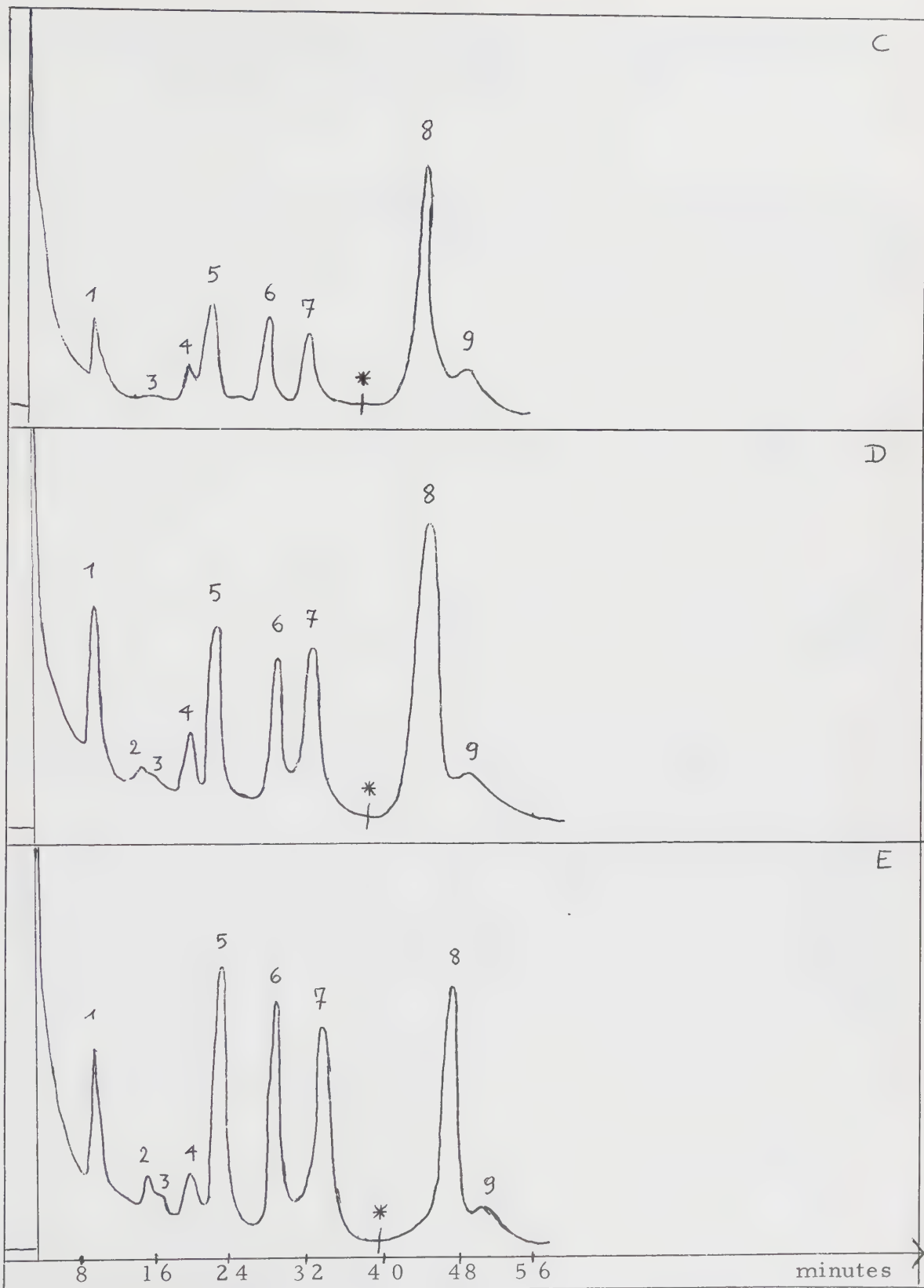
A : cholestérol et acides biliaires étalons. - B : extrait de bile de rats non exercés, non à jeûn ( $2\mu\text{l}$ ). - C : extrait de bile de rat T non exercé, à jeûn ( $1\mu\text{l}$ ). - D : extrait de bile de rat A, exercé, à jeûn ( $2\mu\text{l}$ ). - E : extrait de bile de rat B, exercé, à jeûn, sortant d'une marche de 2 h. ( $2\mu\text{l}$ ).

L'amplification du signal est réduite de moitié à partir du signe (\*).

Pics : 1, cholestérol ; 2, épiLC ; 3, Lithocholique (LC) ; 4, épiDC ; 5, Désoxycholique (DC) ; 6, ChénoDC ; 7, HyoDC ; 8, Cholique ; 9, cétoLC.

Se reporter page 100, légende du tableau 15.





2.4. - DETERMINATION DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DES ACIDES CHOLIQUE ET CHENODESOXYCHOLIQUE DE LA BILE RECUEILLIE APRES UNE INJECTION INTRAPORTALE D'ACETATE RADIOACTIF. - Séries 16 et 16 bis.

Le principe de l'expérimentation est d'injecter de l'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$  à un rat dont on recueille la bile par un catheter placé sur le cholédoque. Pour éviter une trop grande dispersion du traceur et pour réduire l'interférence de facteurs extra-hépatiques, nous avons injecté l'acétate dans la veine porte.

2.4.1. - Protocole opératoire

Les rats ne sont pas exercés. Ils sont utilisés sans jeûne préalable, entre 9 h. et 12 h. (sauf deux d'entre eux, utilisés entre 17 h. et 19 h.). Après anesthésie de l'animal, un catheter est mis en place sur le cholédoque (page 91). On injecte ensuite, dans la veine porte, 0,35 ml d'une solution d'acétate de sodium radioactif (0,226 mg, 100  $\mu\text{C}$ ) dans du serum physiologique (NaCl 0,9 %), à l'aide d'une seringue à insuline de 1 ml au 1/100e, munie d'une aiguille très fine. On recueille la bile pendant les deux heures qui suivent l'injection. Le rat est placé, dès après celle-ci, dans une boîte à gants où une circulation d'air est assurée par une trompe à eau munie d'un piège à  $\text{CO}_2$ .

La bile obtenue est hydrolysée, puis le cholestérol et les acides biliaires sont extraits séparément selon la technique décrite plus haut (page 92). Dans deux cas, nous avons purifié le cholestérol et mesuré son activité spécifique en suivant la méthode décrite ailleurs (page 52). Les acides biliaires sont purifiés par une double chromatographie en couche mince de silicagel avec, pour phase mobile, la première fois, le mélange Acétate d'éthyle-acide acétique (96/4 vol.) (104) et, la seconde fois, la phase supérieure du mélange Toluène-acide acétique-eau (5/5/1/ vol.) (113). La préparation des plaques, le dépôt des solutions sur les plaques, la révélation et l'élution, ont été décrits ailleurs (pages 93 et 53).

Toutefois, comme la détermination d'une activité spécifique exige une extrême pureté des substances analysées, nous avons été conduits à délimiter au plus près les bandes d'acide chénodésoxycholique ou d'acide cholique sur les plaques, au bénéfice de la pureté mais au détriment du rendement.

Après la seconde élution, la solution alcoolique d'acide est évaporée à sec, sous pression réduite, à 65°C; le résidu est repris par un volume d'éthanol 95° tel que la solution contienne de 250 à 500 µg d'acide par ml. Un ml de cette solution est placé dans une coupelle d'aluminium et l'alcool est évaporé sous une lampe à lumière I. R. ; l'activité est déterminée dans un compteur Geiger sans fenêtre à courant d'Argon. Un autre ml de la solution est prélevé pour le dosage colorimétrique; s'il s'agit d'acide cholique, ce ml est dilué cinq fois par de l'éthanol 95° et l'on ne retient, de cette solution diluée, que deux prises de 1 ml et de 0,5 ml. Le dosage est effectué comme il a été dit plus haut (pages 93 et 94).

#### 2.4.2. - Précision des résultats

A l'aide de nombreuses prises de nos acides étalons ou d'acide radioactif purifié, nous avons déterminé l'incertitude affectant les résultats des dosages colorimétriques et les comptes d'impulsions; l'addition de l'incertitude du dosage et de celle du compte d'impulsions (qui, toutes deux, incluent les erreurs de pipette), nous a permis d'évaluer l'incertitude avec laquelle est connue l'activité spécifique de l'acide chénodésoxycholique (4%) et de l'acide cholique (5%).

Il ne nous a pas été possible d'effectuer parallèlement une détermination précise de l'activité totale et de la masse de chaque acide. Pour le calcul de ces grandeurs, nous avons tenu compte des masses d'acides purs effectivement récupérées : or, la technique utilisée entraîne des pertes importantes qui ne sont pas nécessairement les mêmes pour les acides cholique et chénodésoxycholique. Le rapport des masses totales de ces acides débitées en deux heures par le cholédoque et le rapport des activités totales trouvées en deux heures dans ces deux acides, ne sont pas donnés avec une bonne précision : nous en connaissons plutôt l'ordre de grandeur que la valeur exacte.

#### 2.4.3. - Contrôle de pureté des acides soumis aux comptages de radioactivité.

L'efficacité de la purification a été contrôlée par recristallisation des acides radioactifs après dilution par des acides purs inertes. L'acide chénodésoxycholique a été recristallisé dans l'acétone et très abondamment lavé à l'eau bouillante ; l'acide cholique, dans le méthanol coupé d'eau. Le résultat de ces contrôles est indiqué dans le tableau 16, page 108. Un autre contrôle, de moindre portée, a consisté à mesurer, après la première chromatographie, l'activité de la bande contiguë à celle de l'acide chénodésoxycholique (CDC) et contenant la frange non récupérée de la bande de CDC : nous y avons trouvé une activité représentant moins de 4 % de l'activité rencontrée dans CDC (qui est encore purifié par la seconde chromatographie).

#### 2.4.4. - Expériences complémentaires : technique modifiée d'injection de l'acétate.

Notre expérience principale a porté sur six rats. Deux autres expériences avaient été tentées auparavant, avec une série importante de rats non exercés nourris jusqu'à leur utilisation et une série normale de rats T (non exercés), A et B (exercés), utilisés à jeûn. La technique d'injection de l'acétate marqué était différente : l'acétate (0,45 mg - 200  $\mu$ C - dans 1 ml de serum physiologique) était introduit, dans la veine porte, par l'intermédiaire d'un catheter placé sur la branche principale de ce vaisseau. Les avantages de cette manière d'opérer devaient être la possibilité de mieux contrôler le volume injecté, la certitude d'injecter l'acétate dans la veine et non derrière et une meilleure sécurité dans la manipulation du précurseur fortement radioactif. Nous avons perdu la plupart de nos rats avant de comprendre que nos échecs ne provenaient pas de notre impuissance à maîtriser cette technique délicate mais des inconvénients inhérents à celle-ci : pertes de sang lors de la cathétérisation portale et interruption partielle de la circulation entérohépatique par la ligature de la veine porte, entraînant le tarissement du débit biliaire. Nous avons donc abandonné cette pratique pour adopter l'injection directe dans la veine. Nous n'avons obtenu de la bile que de 4 rats : 2 non exercés, non à jeûn et 2 rats B exercés, à jeûn et sortant d'une marche de deux heures.

Nous présenterons les résultats obtenus avec ces quatre rats sous le numéro de série 16 bis.

#### 2.4.5 - Poids des rats de la série 16

Les rats de la série 16 sont les rescapés de la précédente mésaventure pendant laquelle ils avaient pris du poids. Ils étaient plus gros (de 60g) et plus âgés (de 3 semaines) que les rats utilisés dans les précédentes expériences. Cependant ces différences ne pouvaient changer la valeur du genre de renseignements (page 90) que nous cherchions dans cette expérience; de plus, la plus grande taille des animaux facilitait l'injection dans la veine porte et permettait d'espérer un plus important volume de bile, c'est à dire des mesures plus précises.

Tableau 16 - Activités spécifiques des acides cholique et chénodésoxycholique purifiés par double chromatographie en couche mince, avant et après recristallisation.

Contrôle de pureté des acides cholique et chénodésoxycholique extraits de la bile recueillie pendant les 2 h. suivant une injection d'acétate radioactif et purifiés par chromatographie sur plaques. L'acide radioactif purifié est dilué par une masse connue d'acide pur inerte ; son activité spécifique est déterminée. On le recristallise dans l'acétone (chénodésoxycholique) ou le méthanol (cholique) et on détermine à nouveau son activité spécifique.

( a ) CDC : acide chénodésoxycholique ; C : acide cholique

( b ) Ordre de grandeur du facteur de dilution.

( c ) Activité spécifique des acides chénodésoxycholique et cholique avant recristallisation et après recristallisation, en cpm/mg

(compteur Geiger sans fenêtre à courant d'Argon). Avec l'activité spécifique, on donne l'erreur maxima pouvant affecter la grandeur mesurée. Cette erreur est calculée sur la base d'une précision de 4 % et de 5 % pour les déterminations des activités spécifiques, respectivement, des acides chénodésoxycholique et cholique.

| ( a )<br>Acide | ( b )<br>facteur de dilution | ( c )<br>Activité spécifique (cpm/mg) |                          |
|----------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
|                |                              | AVANT<br>cristallisation              | APRES<br>cristallisation |
| CDC            | 10                           | 62,2 $\pm$ 2,5                        | 62,8 $\pm$ 2,5           |
|                | 8                            | 5510 $\pm$ 220                        | 5190 $\pm$ 205           |
| C              | 100                          | 410 $\pm$ 20                          | 390 $\pm$ 20             |

3 -

R E S U L T A T S

3. 1. - Influence de la marche sur le débit de la bile.

Séries 14 et 15 - Tableau 17, page 113.

Le rat B, qui vient de marcher, a un débit biliaire significativement plus fort que celui du rat T (non exercé) ou du rat A (exercé mais au repos depuis 24 h.)

3. 2. - Influence de la marche sur les masses d'acides cholique, désoxycholique, chénodésoxycholique, hyodésoxycholique et cétolithocholique et sur la masse de cholestérol débitées en 2 h. par un catheter biliaire. Séries 14 et 15 - Tableau 18, pages 114 et 115.

Le débit cholédocien d'acide chénodésoxycholique est significativement plus important chez les rats exercés que chez les rats témoins tandis que le débit global d'acides biliaries n'est pas modifié ou tend à diminuer.

Le débit d'acide cétolithocholique est moins fort chez les rats exercés que chez les rats témoins.

Le cholédoque du rat B, qui vient de marcher, débite plus de cholestérol que celui du rat T non exercé, plus de cholestérol et plus d'acide désoxycholique que celui du rat A exercé (au repos depuis 24 h.).

3.3. - Influence de la marche sur la composition de la bile.  
Séries 14 et 15

Tableaux 18, 19 et 20 (page 114 et suivantes) : La composition de la bile est modifiée. Dans la bile du rat exercé, les acides désoxycholique (DC), hyodésoxycholique (HDC) et chénodésoxycholique sont relativement plus abondants et l'acide cholique, moins abondant, que dans la bile du rat non exercé. Ce phénomène est plus net chez le rat exercé qui vient de marcher (rat B). La bile de celui-ci contient plus de métabolites de l'acide cholique (DC, cétolithocholique) et de l'acide chénodésoxycholique (tel HDC) que la bile du rat A (exercé, au repos depuis 24 h.)

Tableau 21 (page 119) : dans ce tableau, nous indiquons, en %, la part de l'acide chénodésoxycholique et de son métabolite l'acide hyodésoxycholique, dans la masse totale d'acides biliaires trouvée dans un ml de bile (chénodésoxycholique, hyodésoxycholique, désoxycholique, cholique, cétolithocholique, épидésoxycholique). Les masses de ces deux derniers acides ont été estimées en interprétant leurs surfaces sur le graphique d'étalonnage du pic important le plus proche : celui du désoxycholique pour l'acide épидésoxycholique et celui du cholique pour l'acide cétolithocholique. Le doute que peut laisser subsister cette façon d'opérer sur la valeur des masses obtenues, nous a conduits à présenter ces résultats en dehors du tableau 20. Les observations que l'on peut faire sont cohérentes avec celles que l'on a faites pour le tableau 20, ci-dessus.

3.4. - Influence du jeûne sur la composition de la bile.  
Séries 15 et 15 bis - Tableau 22, page 120 - Figure 7 B et 7 C, pages 102 et 103.

Nous comparons, dans le tableau 22, les résultats obtenus, d'une part, avec les rats T (non exercés) de la série 15 (tableau 18 B, page 115) (à jeûn) et, d'autre part, avec les rats de la série 15 bis, au nombre de 6, non exercés, non à jeûn, pris dans la même population que les rats T série 15, mais utilisés 8 et 15 jours plus tôt pour des mises au point.

Chez les rats à jeûn, la proportion d'acide chénodésoxycholique est diminuée, celle des métabolites de cet acide et de l'acide cholique, est accrue.

- 3.5 - Activité spécifique et activité totale des acides cholique et chéno-désoxycholique et du cholestérol débités en 2 h. par le canal cholédoque après une injection intraportale d'acétate de sodium-1-<sup>14</sup>C.  
Séries 16 et 16 bis - Tableaux 23 et 24, figure 8, page 122 et suivantes.

Ces résultats montrent de façon significative que, dans la bile, lorsque seules sont marquées les molécules nouvellement formées, l'acide chénodésoxycholique possède une activité spécifique nettement supérieure à celle de l'acide cholique.

Il semble y avoir une relation entre l'incorporation de <sup>14</sup>C dans les acides biliaires et la proportion d'acide chénodésoxycholique dans la bile (Tableau 23, lignes (5) (6) (7) et (9); figure 8).

Les activités trouvées chez les rats 16 bis (avec des injections de 200  $\mu$ C au lieu de 100  $\mu$ C), montrent que l'interruption partielle de la circulation portale ne touche pas la cholestérogénèse : l'activité spécifique du cholestérol biliaire, qui est égale à celle du cholestérol hépatique libre (114), est au moins aussi forte chez le rat 2 de la série 16 bis que chez les rats 1, 2 et 5 de la série 16. Mais cette interruption diminue considérablement la conversion, qu'elle soit directe ou indirecte, du cholestérol libre hépatique en acides cholique et chénodésoxycholique.



Tableau 17 - Volume de bile débité en 2 h. par un catheter placé sur le canal cholédoque de rats non exercés (T), exercés mais au repos depuis 24 h. (A) ou exercés, juste après une marche de 2 h. (B).

Les rats sont à jeûn depuis 24 h. et anesthésiés au Nembutal.

(a) Nombre de rats dans chaque série

(b) Volume de bile recueilli en 2 h., en ml et, pour chaque groupe d'une même série, en pour-cent du volume moyen fourni par les rats T de la série. En ml, on donne la moyenne des mesures individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95% ( $P < 0,05$ ).

(\*) Ecart significatif ( $P < 0,05$ ) entre la valeur indiquée pour les rats A ou B et la valeur indiquée pour les rats T de la même série.

| série | (a)<br>nbre | (b)<br>Volume de bile recueilli (ml) |                         |                             |
|-------|-------------|--------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
|       |             | rats T                               | rats A                  | rats B                      |
| 14    | 49          | 1,55 $\pm$ 0,10<br>100%              | 1,65 $\pm$ 0,10<br>106% | 1,85 $\pm$ 0,20<br>119% (*) |
| 15    | 28          | 1,65 $\pm$ 0,12<br>100%              | 1,50 $\pm$ 0,26<br>91%  | 1,82 $\pm$ 0,13<br>113% (*) |

Tableau 18 - Masses d'acides biliaires et de cholestérol débitées en 2 h. par le canal cholédoque de rats non exercés (T), exercés mais au repos depuis 24 h. (A), exercés, utilisés juste après une marche de 2 h. (B).

Les rats sont à jeûn depuis 24 h. et anesthésiés au Nembutal.

- ( a ) Masses moyennes débitées, en mg et en pour-cent de la masse moyenne débitée par les rats T. En mg, on donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable ( $P < 0,05$ ) ; lorsque cela est nécessaire, cet écart est donné, entre parenthèses, pour  $P < 0,01$ .
- ( b ) Somme des masses des acides cholique (C), désoxycholique (DC), chénodésoxycholique (CDC) et hyodésoxycholique (HDC).
- ( ★ ) ( ★★ ) Ecart significatif entre la valeur indiquée pour les rats A ou B et la valeur indiquée pour les rats T, avec une probabilité de 95 % ( ★ ) ou de 99 % ( ★★ )
- ( ° ) ( °° ) Ecart significatif entre la valeur indiquée pour les rats A et la valeur indiquée pour les rats B, avec une probabilité de 95 % ( ° ) ou de 99 % ( °° )
- ( c ) Pour le cholestérol et l'acide cétolithocholique, dans le tableau 18 B, les résultats n'ont pas pu être exprimés en unités de masse, faute d'étalonnage préalable. On donne l'aire moyenne des pics, rapportée au ml de bile, en pour-cent de l'aire moyenne trouvée pour les rats T.

Tableau 18 A - Série 14 - Dosage colorimétrique - 49 rats

|                                    | ( a )<br>masses d'acides ou de cholestérol débitées en 2 h. (mg) |                                             |                                                  |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|
|                                    | rats T                                                           | rats A                                      | rats B                                           |
| acide<br>Cholique                  | 7,3 $\pm$ 1,3<br>100 %                                           | 6,4 $\pm$ 0,8<br>88 %                       | 7,6 $\pm$ 1,1<br>104 %                           |
| acide<br>Chénodésoxy -<br>cholique | 0,79 $\pm$ 0,16<br>( $\pm$ 0,22)<br>100 %                        | 1,10 $\pm$ 0,24<br>( $\pm$ )<br>139 % ( ★ ) | 1,30 $\pm$ 0,20<br>( $\pm$ 0,28)<br>165 % ( ★★ ) |
| Cholestérol                        | 0,35 $\pm$ 0,04<br>( $\pm$ 0,06)<br>100 %                        | 0,41 $\pm$ 0,1<br>117 %                     | 0,47 $\pm$ 0,07<br>( $\pm$ 0,10)<br>135 % ( ★★ ) |

Tableau 18 B- Série 15 - chromatographie phase gazeuse - 28 rats.

|                                 | (a)<br>Masses d'acides ou de cholestérol débitées en deux heures. |                                              |                                               |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                 | rats T                                                            | rats A                                       | rats B                                        |
| Acide Cholique                  | 10,9 $\pm$ 3,3<br>100%                                            | 6,6 $\pm$ 1,5<br>61% (★)                     | 7,3 $\pm$ 2,3<br>68%                          |
| Acide Chénodésoxy-cholique      | 1,19 $\pm$ 0,44<br>100%                                           | 1,63 $\pm$ 0,48<br>136%                      | 1,88 $\pm$ 0,57<br>157% (★)                   |
| Acide Désoxy - cholique         | 1,19 $\pm$ 0,41<br>100%                                           | 0,94 $\pm$ 0,12<br>( $\pm$ 0,17)<br>79% (°°) | 1,47 $\pm$ 0,28<br>( $\pm$ 0,42)<br>123% (°°) |
| Acide Hyodésoxy-cholique        | 1,58 $\pm$ 0,50<br>100%                                           | 1,31 $\pm$ 0,26<br>83%                       | 1,91 $\pm$ 0,61<br>120%                       |
| Somme de C + CDC + DC + HDC (b) | 14,8 $\pm$ 4,1<br>100%                                            | 10,4 $\pm$ 2,1<br>70%                        | 12,6 $\pm$ 3,0<br>85%                         |
| Acide Cétolitho-cholique        | (c)<br>100%                                                       | (c)<br>40% (★★)                              | (c)<br>51% (★)                                |
| Cholestérol                     | (c)<br>100%                                                       | (c)<br>96% (°)                               | (c)<br>136% (★) (°)                           |

Tableau 19 - Influence de la marche sur la répartition pondérale des acides Cholique, Chénodésoxycholique, Désoxycholique et Hyodésoxycholique dans la bile.

Rapport de la masse de chaque acide à la masse totale des 4 acides, par ml de bile, en %.

Série 15. Nombre de rats : 28. Dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Rats T : non exercés

Rats A : exercés, au repos depuis 24 h.

Rats B : exercés, viennent de marcher 2800 m en 2 h.

Tous les rats sont à jeûn depuis 24 h.

Ce tableau doit se lire de deux façons : verticalement, dans chaque colonne, c'est à dire pour chaque groupe de rats, on donne la masse de chaque acide par ml de bile en pour-cent de la masse totale des quatre acides : la valeur donnée est la moyenne des valeurs individuelles accompagnée de l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) et, lorsque c'est nécessaire, entre parenthèses, pour une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ). Horizontalement, pour chaque acide, on donne la valeur précédente exprimée en pour-cent de la valeur observée, pour cet acide, chez les rats T : ainsi, à la première ligne, troisième colonne (rats B), 57,6 signifie que dans un ml de bile des rats B, la masse d'acide cholique représente 57,6 % de la masse totale des quatre acides ; 79 % signifie que la proportion d'acide cholique dans la masse des quatre acides, chez le rat B, représente 79 % de ce qu'elle est chez le rat T.

( \* ) ( \* \* ) Ecart significatif entre la valeur indiquée pour les rats A ou B et la valeur indiquée pour les rats T, avec une probabilité de 95 % ( \* ) ou de 99 % ( \* \* )

( ° ) ( ° ° ) Ecart significatif entre la valeur indiquée pour les rats A et la valeur indiquée pour les rats B, avec une probabilité de 95 % ( ° ) ou de 99 % ( ° ° ).

Tableau 19 - Légende ci-contre, page 116.

|                                       | % de chaque acide dans la masse totale des quatre acides, par ml de bile. |                                                |                                                 |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|                                       | rats T                                                                    | rats A                                         | rats B                                          |
| % d'acide<br>cholique                 | 72,9 $\pm$ 3,9<br>( $\pm$ 5,6)<br>100%                                    | 62,3 $\pm$ 2,2<br>( $\pm$ 3,2)<br>85% (★★) (°) | 57,6 $\pm$ 4,2<br>( $\pm$ 6,3)<br>79% (★★) (°)  |
| % d'acide<br>chénodésoxy-<br>cholique | 7,8 $\pm$ 1,5<br>( $\pm$ 2,2)<br>100%                                     | 15,4 $\pm$ 2,5<br>( $\pm$ 3,6)<br>198% (★★)    | 15,2 $\pm$ 3,2<br>( $\pm$ 4,8)<br>194 (★★)      |
| % d'acide<br>désoxy-<br>cholique      | 8,8 $\pm$ 3,4<br>100%                                                     | 9,6 $\pm$ 1,5<br>107% (°)                      | 12,1 $\pm$ 2,0<br>138% (°)                      |
| % d'acide<br>hyodésoxy-<br>cholique   | 10,5 $\pm$ 1,4<br>( $\pm$ 2,0)<br>100%                                    | 12,7 $\pm$ 1,1<br>121% (°)                     | 15,1 $\pm$ 2,0<br>( $\pm$ 3,0)<br>144% (★★) (°) |
| Somme                                 | 100                                                                       | 100                                            | 100                                             |

Tableau 20 - Influence de la marche sur les proportions respectives des acides Cholique et Chénodésoxycholique dans la bile.

Pourcentage d'acide Chénodésoxycholique dans la somme des masses d'acide cholique et d'acide chénodésoxycholique, par ml de bile, chez les rats non exercés (T), les rats exercés au repos depuis 24 h. (A) et les rats exercés qui viennent de marcher 2800 m en 2 h. (B). - Les rats sont à jeûn depuis 24 h.

- ( a ) Série 14 : dosage colorimétrique  
Série 15 : dosage par chromatographie en phase gazeuse
- ( b ) Nombre de rats dans chaque série
- ( c ) Proportion moyenne d'acide chénodésoxycholique (CDC) dans la somme des masses des acides CDC et Cholique (C), en pour-cent de cette somme. On donne la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 95 % ( $P < 0,05$ ) et, pour la série 15, entre parenthèses, pour une probabilité de 99 % ( $P < 0,01$ ). Pour chaque groupe d'une même série, le résultat précédent est également exprimé en pour-cent de la valeur observée pour les rats T de la série : par exemple, pour le groupe B de la série 14, l'acide chénodésoxycholique représente, dans la bile, 15,8 % de la somme C + CDC, ce qui est une proportion égale à 148 % de ce qu'on trouve chez les rats T de la même série.
- ( \* ) ( \*\* ) Ecart significatif entre les valeurs indiquées pour les rats A ou B et la valeur indiquée pour les rats T de la même série, avec une probabilité de 95 % ( \* ) ou de 99 % ( \*\* )

| ( a )<br>série | ( b )<br>nbre | ( c )<br>% d'acide CDC dans la somme C + CDC |                                 |                                 |
|----------------|---------------|----------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                |               | rats T                                       | rats A                          | rats B                          |
| 14             | 49            | $10,7 \pm 2,2$                               | $14,4 \pm 2,3$                  | $15,8 \pm 2,6$                  |
|                |               | 100 %                                        | 135 % ( * )                     | 148 % ( * )                     |
| 15             | 28            | $9,7 \pm 1,9$<br>( $\pm 2,7$ )               | $19,8 \pm 2,8$<br>( $\pm 4,0$ ) | $20,6 \pm 4,6$<br>( $\pm 6,8$ ) |
|                |               | 100 %                                        | 203 % ( ** )                    | 212 % ( ** )                    |

Tableau 21 - Influence de la marche sur le pourcentage d'acides de la famille métabolique du chénodésoxycholique dans la masse totale d'acides des deux familles métaboliques du cholique et du chénodésoxycholique, dans la bile. Série 15: 28 rats.

Famille métabolique de l'acide chénodésoxycholique (CDC): acide CDC et acide Hyodésoxycholique (HDC). Famille métabolique de l'acide Cholique (C) : acide C, acide désoxycholique (DC) acide cétolithocholique (céLC) et acide  $3\beta$  12 $\alpha$  dihydroxycholanique ou épidésoxycholique (éDC).

La bile est analysée par chromatographie en phase gazeuse après méthylation et trifluoracétylation des acides biliaires. Les acides Cholique, Désoxycholique, Chénodésoxycholique et Hyodésoxycholique ont été dosés à l'aide d'étalonnages effectués avec des dérivés d'acides purs étalons. Aucun étalonnage n'a été effectué pour les acides Cétolithocholique et Epidésoxycholique dont la surface des pics a été interprétée sur les droites d'étalonnage de l'acide cholique (pour le cétolithocholique) et de l'acide désoxycholique (pour l'Epidésoxycholique).

On donne, pour chaque groupe de rats, la moyenne des valeurs individuelles et l'écart maximal probable pour une probabilité de 99% ( $P < 0,01$ ). Cette valeur moyenne est également exprimée en pour-cent de la valeur observée pour les rats T.

(a) rats T : non exercés - rats A : exercés, au repos depuis 24 h. - rats B : exercés, viennent de marcher 2800m en 2 h. - Tous les rats sont à jeûn depuis 24 h.

(\*\*) Ecart significatif entre la valeur indiquée pour les rats A ou B et la valeur indiquée pour les rats T, avec une probabilité de 99%.

| rats T (a)     | rats A (a)     | rats B (a)     |
|----------------|----------------|----------------|
| 14,8 $\pm$ 2,2 | 24,8 $\pm$ 2,7 | 26,3 $\pm$ 4,6 |
| 100%           | 168% (**)      | 178 % (**)     |

Tableau 22 - Influence du jeûne sur la composition de la bile chez les rats non exercés.

Pourcentage de chacun des acides Cholique, Désoxycholique, Chénodésoxycholique, et Hyodésoxycholique, dans la somme des masses par ml, de ces quatre acides, dans la bile des rats non exercés, à jeûn depuis 24 h., de la série 15 et les rats, non exercés, non à jeûn, de la série 15 bis.

Les rats de la série 15 bis (6 rats, en deux lots de 3 : une seule analyse par lot) appartiennent à la même population que les rats non exercés (T) de la série 15 mais ont été utilisés 8 et 15 jours plus tôt pour des mises au point. Les rats T de la série 15 sont au nombre de 10 : leurs biles ont été analysées séparément.

Les rats sont anesthésiés au Nembutal. La bile est recueillie pendant 2 h. par un catheter branché sur le cholédoque : elle est ensuite analysée par chromatographie en phase gazeuse, après méthylation et trifluoracétylation des acides biliaires.

( a ) données provenant du tableau 19, page 117

Tableau 22 - Légende ci-contre, page 120

|                                | % de chaque acide dans la masse totale des quatre acides. |                |         |                      |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|---------|----------------------|
|                                | Série 15 bis - non à jeûn -                               |                |         | Série 15, à jeûn (a) |
|                                | rats 1 - 2 - 3                                            | rats 4 - 5 - 6 | moyenne |                      |
| % d'acide cholique             | 74,9 %                                                    | 72,8 %         | 73,9 %  | 72,9 %               |
| % d'acide chénodésoxy-cholique | 19,2 %                                                    | 21,5 %         | 20,3 %  | 7,8 %                |
| % d'acide désoxy-cholique      | 1,7 %                                                     | 1,9 %          | 1,8 %   | 8,8 %                |
| % d'acide hyodésoxy-cholique   | 4,2 %                                                     | 3,8 %          | 4,0 %   | 10,5 %               |
| Somme                          | 100,0                                                     | 100,0          | 100,0   | 100,0                |

Tableau 23 - Activité spécifique et activité totale du cholestérol et des acides cholique et chénodésoxycholique de la bile recueillie pendant 2 h. après une injection intraportale d'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$ .

Les rats sont anesthésiés au Nembutal, sans jeûne préalable ; un catheter est branché sur le cholédoque et on injecte l'acétate ( $100\ \mu\text{C}$ , - 0,226 mg dans 0,35 ml de serum physiologique) dans la branche principale de la veine porte avec une seringue à insuline munie d'une aiguille très fine. Les substances à analyser sont isolées, dosées colorimétriquement et soumises au comptage dans un compteur Geiger à fenêtre (pour contrôle) et dans un compteur Geiger sans fenêtre à courant d'Argon. Pour le cholestérol, une seule analyse a été effectuée sur le mélange des extraits biliaires des rats 1, 2 et 5.

Poids des rats et volumes de bile recueillis, pour les rats 1 à 6, dans l'ordre :

poids ( g ) : 365 - 375 - 390 - 350 - 370 - 300

bile ( ml ) : 2,15 - 1,60 - 1,10 - 1,50 - 1,70 - 1,40

- ( 1 ) Heure à laquelle est faite l'injection d'acétate
- ( 2 ) Activité spécifique (A. S.) de l'acide chénodésoxycholique (CDC) en milliers de cpm/mg
- ( 3 ) Activ. spécif. (A. S.) de l'acide cholique (C),  $10^3$  cpm/mg
- ( 4 ) Rapport des activités spécifiques des acides chénodésoxycholique et cholique (CDC/C)
- ( 5 ) Activité totale (A. T.) de l'acide chénodésoxycholique (CDC) purifié extrait de la bile débitée en 2 h. (milliers de cpm)
- ( 6 ) Activ. totale (A. T.) de l'acide cholique (C), milliers de cpm
- ( 7 ) Activité totale (A. T.) des deux acides, milliers de cpm
- ( 8 ) Activité totale (A. T.) de l'acide chénodésoxycholique (CDC) en pour-cent de l'activité totale des 2 acides (CDC/C + CDC)
- ( 9 ) Masse d'acide chénodésoxycholique (CDC) en pour-cent de la masse totale des deux acides dans la bile débitée en 2 h. (masse CDC/C + CDC)
- ( 10 ) Activité spécifique (A. S.) du cholestérol (CST) extrait de la bile des rats 1, 2 et 5, en milliers de cpm/mg
- ( 11 ) Valeur approximative du rapport des activ. spécif. du cholestérol (CST) et de l'acide chénodésoxycholique (CDC) de la bile des rats 1, 2 et 5 (A. S. CST/CDC)
- ( 12 ) Valeur approximative du rapport des activ. spécif. du cholestérol (CST) et de l'acide cholique (C) de la bile des rats 1, 2 et 5 : A. S. CST/C

Tableau 23 - Légende ci-contre, page 122

|      |                                                  |       |                     |       |       |       |       |
|------|--------------------------------------------------|-------|---------------------|-------|-------|-------|-------|
| (1)  | Heure                                            | 9 h   | 10 h                | 10 h  | 10 h  | 17 h  | 17 h  |
| (2)  | A. S. CDC                                        | 41,5  | 9,62                | 14,40 | 10,93 | 4,14  | 2,80  |
| (3)  | A. S. C                                          | 13,9  | 3,26                | 6,33  | 3,32  | 1,41  | 0,48  |
| (4)  | A. S. $\frac{\text{CDC}}{\text{C}}$              | 2,98  | 2,94                | 2,28  | 3,29  | 2,94  | 5,84  |
| (5)  | A. T. CDC                                        | 75,9  | 11,2                | 5,75  | 5,53  | 2,19  | 1,19  |
| (6)  | A. T. C                                          | 39,9  | 17,3                | 9,00  | 8,23  | 9,20  | 2,59  |
| (7)  | A. T. C + CDC                                    | 115,8 | 28,53               | 14,75 | 13,76 | 11,39 | 3,78  |
| (8)  | A. T. $\frac{\text{CDC}}{\text{C} + \text{CDC}}$ | 66%   | 39%                 | 39%   | 40%   | 19%   | 32%   |
| (9)  | $\frac{\text{masse CDC}}{\text{C} + \text{CDC}}$ | 38%   | 18%                 | 21%   | 18%   | 8%    | 8%    |
| (10) | A. S. SCT rats 1, 2, 5                           |       | 91,6                |       |       |       |       |
| (11) | A. S. $\frac{\text{CST}}{\text{CDC}}$            |       | 5 (entre 3 et 7)    |       |       |       |       |
| (12) | A. S. $\frac{\text{CST}}{\text{C}}$              |       | 15 (entre 10 et 20) |       |       |       |       |
|      |                                                  | rat 1 | rat 2               | rat 3 | rat 4 | rat 5 | rat 6 |

Tableau 24 - Activité spécifique et activité totale du cholestérol et des acides cholique et chénodésoxycholique de la bile recueillie pendant 2 h. après injection intraportale, par l'intermédiaire d'un catheter portal, d'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$

Les rats 1 et 2, non exercés, ne sont pas à jeûn. Les rats 3 et 4, exercés, à jeûn depuis 24 h., viennent de marcher 2 h. Anesthésie au Nembutal. Bile recueillie par catheter branché sur le cholédoque. Catheter placé sur la branche principale de la veine porte, après ligature de celle-ci. On injecte l'acétate ( $200\ \mu\text{C}$  - 0,45 mg dans 1 ml de serum physiologique) par le catheter portal. Heure de l'injection : 9 h.  
Poids des rats, dans l'ordre : 260 - 260 - 290 - 285 grammes  
Volume de bile recueilli, dans l'ordre : 0,20 - 0,65 - 1,30 - 1,40 ml.

- ( 1 ) Activité spécifique (A. S.) de l'acide chénodésoxycholique (CDC) en cpm/mg
- ( 2 ) Activ. spécif. (A. S.) de l'acide cholique (C) en cpm/mg
- ( 3 ) Rapport des activ. spécif. (A. S.) des acides chénodésoxycholique et cholique (CDC/C)
- ( 4 ) Activité totale (A. T.) de l'acide chénodésoxycholique (CDC) purifié, extrait de la bile débitée en 2 h. (cpm)
- ( 5 ) Activ. totale (A. T.) de l'acide cholique (C), en cpm.
- ( 6 ) Activité totale (A. T.) des deux acides (C + CDC), cpm.
- ( 7 ) Activ. totale (A. T.) de l'acide chénodésoxycholique en pour-cent de l'activ. totale des 2 acides (CDC/C + CDC)
- ( 8 ) Masse d'acide chénodésoxycholique en pour-cent de la masse totale des 2 acides dans la bile débitée en deux heures (masse CDC/C + CDC)
- ( 9 ) Activité spécifique (A. S.) du cholestérol de la bile du rat 2, en cpm (CST : cholestérol)
- ( 10 ) Activité totale (A. T.) du cholestérol (CST) de la bile débitées en 2 h. par le rat 2
- ( 11 ) Rapport des activ. spécif. (A. S.) du cholestérol et de l'acide chénodésoxycholique de la bile du rat 2
- ( 12 ) Rapport des activ. spécif. (A. S.) du cholestérol et de l'acide cholique (CST/C) de la bile du rat 2

Les activités sont exprimées en coups par minute (cpm) d'un compteur Geiger sans fenêtre à courant d'Argon.

Tableau 24 - Légende ci-contre, page 124

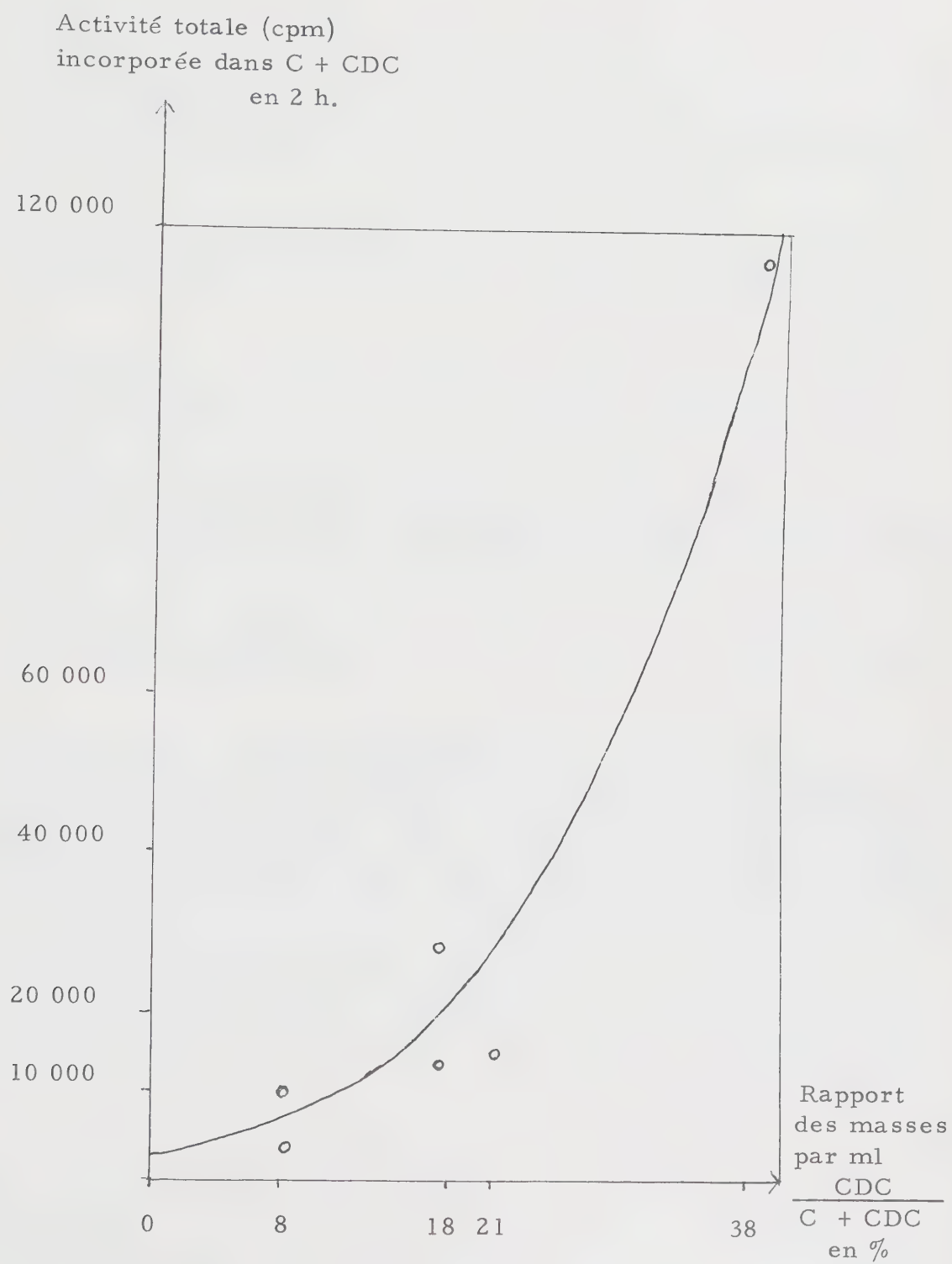
|      |                                 | rat 1 | rat 2   | rat 3 | rat 4 |
|------|---------------------------------|-------|---------|-------|-------|
| (1)  | A. S. $\frac{CDC}{C}$           | 716   | 1755    | 2200  | 4380  |
| (2)  | A. S. $\frac{C}{C}$             | 41    | 303     | 246   | 942   |
| (3)  | A. S. $\frac{CDC}{C}$           | 17,4  | 5,8     | 8,9   | 4,7   |
| (4)  | A. T. $\frac{CDC}{C}$           | 73    | 1383    |       |       |
| (5)  | A. T. $\frac{C}{C}$             | 93    | 546     |       |       |
| (6)  | A. T. $\frac{C + CDC}{C + CDC}$ | 166   | 1929    |       |       |
| (7)  | A. T. $\frac{CDC}{C + CDC}$     | 44%   | 72%     |       |       |
| (8)  | masse $\frac{CDC}{C + CDC}$     | 4%    | 30%     |       |       |
| (9)  | A. S. $\frac{CST}{CST}$         |       | 230 000 |       |       |
| (10) | A. T. $\frac{CST}{CST}$         |       | 33 000  |       |       |
| (11) | A. S. $\frac{CST}{CDC}$         |       | 130     |       |       |
| (12) | A. S. $\frac{CST}{C}$           |       | 760     |       |       |

Figure 8 - Vitesse de conversion du cholestérol en acides biliaires en fonction de la proportion d'acide chénodésoxycholique dans la bile.

Série 16 : six rats.

En ordonnées : activité totale incorporée dans les acides cholique (C) et chénodésoxycholique (CDC) de la bile débitée en deux heures par des rats porteurs de catheters biliaires, après une injection intraportale d'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$ . L'activité est exprimée en coups par minute (cpm) au compteur Geiger sans fenêtre à circulation d'Argon.

En abscisses : pourcentage d'acide chénodésoxycholique (CDC) dans la somme (C + CDC) des masses d'acides cholique (C) et chénodésoxycholique débitées par le cholédoque en deux heures.



## DISCUSSION DES RESULTATS

### des séries 16 et 16 bis

Les résultats obtenus avec les séries 14 et 15 seront discutés plus loin, avec l'ensemble des résultats concernant l'influence de la marche sur le métabolisme du cholestérol. Nous nous contenterons ici de chercher la signification des données des séries 16 et 16 bis.

Dans la bile des rats de ces deux séries, seules peuvent être radioactives les molécules d'acide cholique et d'acide chénodésoxycholique nouvellement formées : les molécules revenant de l'intestin sont inertes. Dans ces conditions, on peut concevoir diverses interprétations des résultats obtenus.

4.1. - Première interprétation : formation de l'acide chénodésoxycholique à partir de cholestérol libre et de l'acide cholique à partir d'un ester de cholestéryle.

Dans le foie et le serum de rat porteur de catheter biliaire, après injection sous-cutanée d'acétate radioactif, CHEVALLIER (114) a trouvé un cholestérol libre plus actif que le cholestérol estérifié (dans le rapport 2/1 après deux heures). Si l'acide chénodésoxycholique est formé à partir de cholestérol libre et l'acide cholique à partir de cholestérol estérifié, la différence d'activité spécifique observée dans notre expérience est expliquée par la différence de substrat de synthèse.

Toutefois, des arguments ont été apportés pour soutenir que l'hydroxylation du cholestérol en position  $7\alpha$ , opération exigée par les deux processus de synthèse (101), exige l'estérification du cholestérol par un acide gras polyinsaturé tel que l'acide linoléique : du cholestérol -  $^{14}\text{C}$  injecté à des rats, est estérifié, dans le foie, surtout par des acides polyéthyléniques (115 - 116) ;

ces esters polyinsaturés, plus facilement oxydés que les autres, sont métabolisés plus rapidement (115 - 117) et l'on a isolé, dans le foie, le sérum et la peau de rat, du 7 $\alpha$  hydroxycholestérol estérifié (101); BOYD (118) a suggéré que l'estérification du cholestérol pouvait faciliter l'hydroxylation en 7 $\alpha$  par réaction entre l'hydrogène 7 $\alpha$  du cholestérol et le carbone 13 du linoléique et formation intermédiaire d'un composé hydroperoxydé. Ces faits rendent peu probable l'hypothèse d'une formation d'acide chénodésoxycholique à partir de cholestérol libre.

#### 4. 2. - Seconde interprétation : formation d'acide chénodésoxycholique et d'acide cholique à partir d'esters de cholestéryle différents.

L'acide chénodésoxycholique pourrait procéder d'un ester, par exemple le linoléate, moins abondant mais plus rapidement métabolisé (115-116-117), donc plus radioactif, que l'ester dont dériverait l'acide cholique, par exemple l'arachidonate qui se forme rapidement à partir du linoléate par transestérification (115) ou l'oléate qui est beaucoup plus abondant dans le foie, donc plus diluant pour l'activité spécifique (119-120). Cette hypothèse est plausible mais encore gratuite.

#### 4. 3. - Troisième interprétation : vitesses de formation différentes pour les deux acides.

Le processus de synthèse de l'acide chénodésoxycholique pourrait être plus rapide que celui de l'acide cholique, lequel, il est vrai, exige une hydroxylation supplémentaire en 12; l'acide chénodésoxycholique produit pendant les deux heures de l'expérience aurait ainsi, à chaque instant, une activité plus proche de la forte activité spécifique du substrat. Ce raisonnement n'est valable que si la courbe d'activité spécifique du substrat en fonction du temps présente une forte pente, ce qui n'est pas le cas : l'activité spécifique du cholestérol libre atteint rapidement un palier et celle des esters de cholestéryle ne croît pas assez rapidement (114) à moins de supposer aux processus de formation des acides biliaires, une extrême lenteur peu vraisemblable.

4.4. - Quatrième interprétation : dilution inégale des molécules nouvellement formées par les molécules inertes revenant des intestins.

Les molécules des deux acides formées à un instant donné à partir du même substrat ou de substrats différents d'activités spécifiques proches, présenteraient à peu près la même activité spécifique mais, dans la bile, se trouveraient diluées par les molécules inertes revenant de l'intestin, l'acide cholique supportant la plus forte dilution. Cette interprétation implique une plus forte absorption intestinale de l'acide cholique que de l'acide chénodésoxycholique, et, inversement, une meilleure excrétion fécale de l'acide chénodésoxycholique (ou de ses métabolites) que de l'acide cholique (ou de ses métabolites) : la demie-vie de l'acide chénodésoxycholique serait nettement plus brève que celle de l'acide cholique et la production d'acide chénodésoxycholique représenterait une meilleure voie d'élimination du cholestérol que la production d'acide cholique. Dans ces conditions, une bile pauvre en acide chénodésoxycholique dénoterait un faible catabolisme du cholestérol tandis qu'une bile riche en cet acide serait le fait d'un organisme métabolisant rapidement le cholestérol : c'est bien ce que semble montrer la progression des activités totales produites en deux heures en fonction de la proportion d'acide chénodésoxycholique dans la bile (lignes 5, 6, 7 et 9 du tableau 23, page 123 ; figure 8, page 127).

C H A P I T R E   Q U A T R I E M E

DISCUSSION ET INTERPRETATION GENERALES



En toute rigueur, les conclusions que nous pourrions tirer de nos recherches concerneront l'influence de la marche, et non d'un autre type d'exercice, sur certains aspects du métabolisme du cholestérol chez le rat Wistar mâle adulte. Lorsque nous serons conduits à citer des faits concernant d'autres types d'exercice, d'autres espèces animales ou d'autres aspects du métabolisme général, nous le ferons avec les réserves qui s'imposent.

### 1 - Accélération de la cholestérogénèse hépatique.

Un fait semble acquis (page 84) : le foie du rat exercé possède une activité cholestérogénique nettement supérieure à celle du rat maintenu au repos. Ce phénomène est plus net chez le rat qui vient de marcher. L'accroissement de biosynthèse n'entraîne aucune accumulation de cholestérol hépatique ou sérique. Les résultats d'ALEKSANDROW (35), par leur concordance avec les nôtres, en sont une solide confirmation.

### 2 - Modification de la composition de la bile

Un second fait paraît assuré : l'exercice provoque, chez le rat, une modification importante de la répartition des acides biliaires dans la bile (page 110, tableaux 18, 19, 20 et 21, pages 114 et suivantes) : la proportion d'acide chénodésoxycholique croît sensiblement tandis que décroît celle de l'acide cholique. Immédiatement après une marche, la masse de cholestérol passant dans la bile est accrue. Par contre, la masse totale d'acides biliaires circulant par le canal cholédoque, pendant un temps donné, n'est pas plus importante chez le rat exercé que chez le rat non exercé et peut même être plus faible.

### 3 - Accélération du catabolisme hépatique

Sans mériter la même confiance, du moins à cet instant de notre analyse, un troisième fait s'affirme avec une bonne probabilité : l'exercice activerait le catabolisme hépatique ou l'excrétion du cholestérol. En effet, l'exercice tend à annuler l'accumulation de cholestérol hépatique provoquée par un régime très gras (tableau 5, page 39) (page 44) (37-121).

GOLLNICK (37) observe que la marche et la nage accélèrent l'excrétion fécale de stérols. Enfin, l'accélération de la cholestérogénèse sans accumulation de cholestérol sérique ou hépatique implique une élimination hépatique accrue (tableaux 4 et 5, pages 37 et 41) (35).

D'autres résultats proposés par la littérature peuvent confirmer les précédents mais ils ont été obtenus dans des conditions expérimentales différant sensiblement des nôtres (espèce animale, type d'exercice, régime alimentaire). POPOVA trouve que le rat exercé à la nage catabolise plus activement le cholestérol hépatique que le rat non exercé (page 85) (36). HEBBELINCK (38) a montré que, chez la souris, la marche entraînait une meilleure élimination, par la voie des acides biliaires, du cholestérol radioactif administré par injection intrapéritonéale. On a aussi observé une baisse du taux de cholestérol hépatique (41) ou de la masse totale de cholestérol hépatique (39 - 40) chez le rat exercé à la nage et nourri sur un régime normal ou supplémenté en cholestérol.

#### 4 - Cohérence de notre interprétation des résultats.

Nous constatons que le débit global d'acides biliaires est inchangé, voire diminué et, dans le même temps, nous prétendons que le catabolisme hépatique du cholestérol est fortement accéléré. Ces deux propositions sont-elles compatibles ? Il est, en effet, bien admis (99) que la formation d'acides biliaires constitue la principale voie d'élimination du cholestérol hépatique (87 %).

##### 4.1. - Existence de deux ensembles métaboliques d'acides biliaires différant par leurs vitesses de renouvellement.

La solution du problème sera trouvée dans l'abandon d'une hypothèse commode mais fallacieuse : on a pris l'habitude d'évaluer la production d'acides biliaires en fonction du débit d'acide cholique ou du débit global d'acides biliaires dans le cholédoque ; implicitement, on admettait que les acides produits à chaque instant par le foie (essentiellement, chez l'homme et le rat, les acides cholique et chénodésoxycholique) sont tous à peu près également dilués par les acides absorbés dans l'intestin et renvoyés au foie. Tout en reconnaissant à ces deux acides des voies de formation distinctes, on admettait qu'ils formaient un ensemble homogène.

Nous pensons, au contraire, qu'ils forment deux "ensembles métaboliques" bien distincts, différant notamment par leurs vitesses de renouvellement.

Notre opinion s'appuie sur plusieurs arguments. Les premiers d'entre eux concernent les recherches entreprises depuis longtemps sur l'absorption intestinale des acides biliaires et fort bien exposées par VAN BELLE (99). Cet auteur, en tenant compte de tous les travaux antérieurs, estime à 96,5% la part d'acide cholique réabsorbée dans l'intestin, sous sa forme primitive ou sous forme de métabolites tels que l'acide désoxycholique. L'absorption intestinale de l'acide chénodésoxycholique lui-même n'a pas été mesurée. Mais on a montré que l'acide lithocholique, métabolite du chénodésoxycholique, se trouve, dans le gros intestin, sous une forme qui le rend moins facilement absorbable que les métabolites de l'acide cholique (99-101-122). On a observé que l'acide désoxycholique, fort bien réabsorbé, activement transformé en acide cholique dans le foie, peut être trouvé en quantités notables dans la bile, tandis que l'acide lithocholique, pratiquement inexistant dans la bile, est très abondant dans les fèces (123 à 128) (Tableaux 18 et 19, pages 114 et suivantes) (page 99 dernières lignes).

Les indices de discrimination dans l'absorption intestinale sont, en effet, confirmés par la composition de la fraction acide des fèces. Celle-ci doit être comparée à la composition de la bile : l'existence de deux ensembles métaboliques d'acides biliaires, différant par leur vitesse de renouvellement, doit se traduire par une variation de la part de chacun dans la bile et dans les excréments. Cette variation ne peut être imputée qu'à une différence du coefficient d'absorption intestinale.

Nous disposons de plusieurs données concernant la composition de la bile mais d'une seule analyse de fèces de rats (126). Celle-ci, due à MAKITA, a été effectuée avec les excréments d'animaux recevant une alimentation tenue pour inhibitrice de la production d'acides biliaires (99); ce facteur possible d'incertitude devait être signalé mais nous remarquerons, en contrepartie, que ce facteur joue en défaveur de notre argumentation, ce qui rend plus valide l'utilisation de ces données dans notre raisonnement. MAKITA a trouvé, dans les fèces de rat, 61% d'acides (lithocholique et hyodésoxycholique) provenant de l'acide chénodésoxycholique et 39% (désoxycholique et cétolithocholique) provenant de l'acide cholique.

Dans la bile, on admet généralement, à la suite d'ERIKSSON (130 à 132), que les masses d'acide chénodésoxycholique et d'acide cholique sont dans le rapport 20/80 (99 - 101), chez le rat normalement nourri. Nous acceptons cette valeur moyenne en faisant observer qu'elle est susceptible de varier au cours de la journée ou d'une saison à l'autre et en fonction du contenu intestinal, c'est à dire, en fonction du laps de temps séparant la cathétérisation du dernier repas. Si nous ne retenons que les valeurs obtenues pendant les 6 premières heures de cathétérisation, pendant lesquelles la composition de la bile serait assez peu modifiée par sa dérivation (130 - 133), ERIKSSON a trouvé, dans la bile, un rapport en masses chénodésoxycholique/cholique de 25/75 pour deux rats (130) et de 13/87 pour 4 rats (131). Nous avons trouvé, chez des rats non à jeûn, 20/80 (tableau 22, page 121) ou 25/75 (tableau 23, page 123), le matin et 8/92 (tableau 23) en fin d'après-midi ; chez des rats à jeûn, le matin, 10/90 (tableau 22). BEHER (134) trouve environ 15/85 chez le rat femelle.

La comparaison des proportions observées dans la bile et dans les fèces est éloquente ; mais celle des proportions trouvées dans la bile et dans le sang portal ne l'est pas moins. CRONHOLM (135) a dosé, chez 8 rats Sprague-Dawley de 250 g, cinq acides biliaires retournant des intestins au foie par la veine porte ; l'acide cholique y représente 67 % du total et l'acide chénodésoxycholique, 5 % : le rapport est de 7/93. S'il est de 20/80 dans la bile, on conçoit quelle différence existe, entre les acides cholique et chénodésoxycholique, dans la dilution des molécules nouvellement formées par les molécules revenant de l'intestin.

Telle est aussi la signification que l'on peut donner, avec le plus de vraisemblance, aux résultats que nous avons obtenus avec la série 16 (et, avec réserves, la série 16 bis) (tableaux 23 et 24, pages 123 et 125) : après une injection intraportale d'acétate de sodium - 1 -  $^{14}\text{C}$ , à un rat porteur d'un catheter biliaire, l'activité spécifique de l'acide chénodésoxycholique de la bile est 3 fois plus forte que celle de l'acide cholique (de 5 à 17 fois plus dans la série 16 bis).

CRONHOLM, dans la publication citée plus haut, présente les proportions de divers acides biliaires dans la masse totale de ces acides trouvée en différents points du circuit intestinal (étude sur deux rats de 310 et 350 g) :

l'ensemble métabolique de l'acide chénodésoxycholique (chénodésoxycholique + hyodésoxycholique +  $3\alpha$  6  $\beta$  7  $\beta$  trihydroxycholanique ou  $\beta$  muricholique), qui représente, en moyenne, 28% de la somme des deux ensembles métaboliques dans le haut de l'intestin grêle et 33% dans le bas, fournit 50% de cette somme dans le cecum. Plus se poursuit l'absorption intestinale, plus forte est la part de l'ensemble métabolique du chénodésoxycholique dans ce qui n'est pas absorbé.

La synthèse des arguments présentés jusqu'ici est donc la suivante : dans la bile, le rapport des masses d'acide désoxycholique à celles de l'acide cholique vaut 20/80; dans l'intestin, ce rapport (ou celui des masses des métabolites des deux acides) augmente progressivement pour atteindre 50/50 dans le cecum et 61/39 dans les excréments; dans le sang portal qui véhicule vers le foie les acides absorbés par l'intestin au cours de leur transit, le rapport vaut 7/93; à cela, il faut ajouter les indices d'inégale absorption intestinale des acides désoxycholique et lithocholique signalés plus haut (page 135) et les activités spécifiques différentes des acides chénodésoxycholique et cholique dans l'expérience n°16.

Ce faisceau d'arguments acquiert valeur de preuve par sa cohérence et sa convergence. Pour emporter la conviction, cependant, il est nécessaire de fournir une preuve directe. C'est ce que vient d'apporter une récente publication de BEHER (136) : la durée de demi-vie des acides cholique et chénodésoxycholique a été déterminée, chez des rats, par la mesure des activités trouvées pendant 9 jours dans les fèces, après une injection d'acide cholique  $-^{14}\text{C}$  ou d'acide chénodésoxycholique  $-^{14}\text{C}$  : la demi-vie de l'acide chénodésoxycholique est considérablement plus courte que celle de l'acide cholique. Ainsi, l'ensemble métabolique de l'acide chénodésoxycholique se caractérise par une vitesse de renouvellement plus grande que celle de l'ensemble métabolique de l'acide cholique.

#### 4.2 - Relations entre la vitesse de conversion du cholestérol en acides biliaires et les dimensions de l'ensemble métabolique de l'acide chénodésoxycholique.

Deux faits nouveaux semblent maintenant bien assurés : l'existence de deux ensembles métaboliques d'acides biliaires différant sensiblement par leurs propriétés - et la plus grande vitesse d'élimination de l'acide chénodésoxycholique, liée à une absorption intestinale plus faible.

Dès lors, il devient clair qu'une augmentation de la part de l'acide chénodésoxycholique dans la bile, traduit une accélération du catabolisme hépatique du cholestérol, même si le débit global d'acides biliaires est étal ou même diminué. Plus grandes sont les dimensions de l'ensemble métabolique de l'acide chénodésoxycholique, plus forte est la production d'acides biliaires.

A l'appui de cette conclusion, nous citerons deux autres publications récentes de BEHER : par l'administration de cholestyramine à des rats, BEHER obtient un renouvellement plus rapide des acides biliaires mais observe que les dimensions du "pool" global de ces acides n'en sont pas modifiées (137) ; ailleurs, BEHER observe que l'administration de cholestérol à des rats normaux accroît la vitesse de conversion des stérols hépatiques en acides biliaires sans modifier les dimensions du "pool" global de ces acides mais en augmentant la proportion d'acide chénodésoxycholique dans la bile ; chez le rat hypophysectomié, le cholestérol administré a des effets inverses : le renouvellement des acides biliaires est plus lent et si la taille de leur "pool" n'est pas changée, la proportion d'acide chénodésoxycholique est réduite (138). En d'autres termes, il n'y a pas de lien défini entre la taille du "pool" global (cholique + chénodésoxycholique) des acides biliaires et la vitesse de production de ces acides ; au contraire, les variations de dimensions de l'ensemble métabolique de l'acide chénodésoxycholique ont même sens que les variations de la production d'acides biliaires.

La signification des résultats obtenus par l'analyse de la bile (séries 14 et 15, tableaux 18 et suivants), apparaît donc clairement : l'exercice accélère la production d'acides biliaires en favorisant la production d'acide chénodésoxycholique au détriment de la formation d'acide cholique.

## 5 - Accroissement de l'excrétion biliaire de cholestérol.

L'exercice provoque également une augmentation du débit biliaire de cholestérol (tableau 18, pages 114 - 115). Cette augmentation, comme celle du débit d'acide chénodésoxycholique, traduit un accroissement d'excrétion biliaire beaucoup plus important qu'il ne semble à première vue. On pourrait, en effet, être tenté de considérer comme négligeable une augmentation du débit cholédocien de cholestérol, du fait que, dans la bile, on trouve 20 fois moins de cholestérol que d'acide cholique.

Le raisonnement à tenir ici est celui que nous avons tenu pour l'acide chénodésoxycholique, mais il est plus commode : l'absorption intestinale du cholestérol a été étudiée longuement par de nombreux chercheurs. Le coefficient d'absorption du cholestérol est de 50 à 80% (139 à 143); celui de l'acide cholique, on l'a vu, doit être de l'ordre de 96-97%. Par conséquent, si le rapport des débits biliaires de cholestérol et d'acide cholique est de 5/95 (tableau 18, page 114), le rapport des masses effectivement excrétées par la voie biliaire est d'environ 25/100. Une augmentation du cholestérol biliaire de 36% (tableau 18 A et B) a donc plus de signification que ne le laisse prévoir le rapport des masses de cholestérol et d'acides biliaires trouvées dans la bile.

#### 6 - Influence de l'exercice sur le métabolisme du cholestérol dans les glandes surrénales.

La seule observation que nous avons faite est celle d'une augmentation de poids des surrénales provoquée par l'exercice (tableau 2, page 33). Ce serait un argument bien tenu pour affirmer que le travail entraîne une augmentation du métabolisme surrénalien du cholestérol; d'autant plus tenu que la morphologie et le poids des surrénales, selon VECSEI (144), ne changent pas proportionnellement au degré de production ou de sécrétion d'hormones. Que plusieurs auteurs aient signalé un phénomène identique d'hypertrophie des surrénales, chez des rats exercés à la nage (39 - 40 - 145 à 147) peut confirmer le fait, non renforcer l'argumentation. De plus de poids en ce sens, sont les publications signalant, chez l'homme ou l'animal, un accroissement du taux sérique (148) et de l'excrétion (149) de 17-hydroxy-stéroïdes ou de l'excrétion de 11-désoxy-17-cétosréroïdes (150) provoqué par l'exercice. Une publication russe (151) fait état d'une hypertrophie et d'une fonction sécrétrice accrue du cortex surrénalien chez le rat exercé à la marche.

De là, on peut tirer l'hypothèse encore fragile d'une formation d'hormones corticostéroïdes, donc d'un catabolisme du cholestérol, accrus par l'exercice, rien de plus.

#### 7 - Influence de l'exercice sur le taux de cholestérol sérique total et sur le degré d'estérification du cholestérol sérique.

Ni ALEKSANDROW (35) ni nous-mêmes (Tableau 6, page 41) n'avons observé de modification du taux de cholestérol sérique total chez le rat exercé à la marche.

Tout au plus avons-nous pu signaler, sans pouvoir l'assurer, une baisse de ce taux perceptible juste après l'exercice (page 27 - tableau 6, page 41). Compte tenu du rapide courant d'échange existant entre cholestérol sérique et cholestérol hépatique (114 - 152), il est facile d'admettre, mais avec de fortes réserves sur la valeur de cette hypothèse, qu'un catabolisme hépatique brusquement accru provoque une baisse momentanée du taux sérique pendant ou juste après l'exercice.

On observe une augmentation mieux affirmée du taux d'estérification du cholestérol sérique chez le rat B qui vient de marcher par rapport au rat A (exercé, au repos depuis 24 h.) et une baisse de ce taux chez le rat A par rapport au rat non exercé T (du moins lorsque le rat est normalement nourri) (tableau 7, page 43). Y-a-t-il une relation entre ces faits et l'activation du métabolisme hépatique du cholestérol ? S'il en existe, on la trouvera peut-être en considérant les données que nous évoquions plus haut (pages 128 - 129, paragraphe 4.1), concernant le rôle possible de l'estérification dans le catabolisme du cholestérol. Faute d'informations suffisantes, entrer plus loin dans l'interprétation de ces faits serait abusif.

#### 8 - Localisation de l'action du travail sur le métabolisme du cholestérol.

Quel est le mécanisme d'action du travail sur le métabolisme du cholestérol ? Nous avons tenté de répondre en formulant et en mettant à l'épreuve l'hypothèse d'une intervention de l'exercice dans la production hépatique de NADPH par la voie des pentoses. Nous n'avons pas pu mettre une telle action en évidence ; nos résultats tendent, au contraire, à l'infirmier (tableau 14, page 83 ; page 85) mais ils ont été obtenus avec des rats à jeûn depuis 24 h. Le fonctionnement du cycle des pentoses, dans le foie, est fortement déprimé par la privation de nourriture (91 - 153 à 157). Nous aurions peut-être obtenu des résultats différents avec des rats normalement alimentés. On peut cependant admettre, sous réserve de confirmation, que l'accélération du métabolisme hépatique du cholestérol n'est pas nécessairement accompagné d'une stimulation du cycle des pentoses, puisqu'elle semble ne pas l'être chez l'animal à jeûn.

Une seconde hypothèse plausible consiste à situer l'action de l'exercice sur l'hydroxylation en  $7\alpha$  du cholestérol. Cette intervention pourrait s'exercer sur les enzymes responsables de l'hydroxylation ou, comme nous l'avons remarqué plus haut (parag. 7, page 140; parag. 4.1, p. 128-129), sur le processus d'estérification, voire sur le métabolisme des acides gras essentiels tels que l'acide linoléique. Ce serait rejoindre la masse énorme et hétérogène de documents accumulés par la recherche sur les rapports entre cholestérol et régime alimentaire. Cette jonction, cependant, exigerait des informations plus amples que celles dont nous disposons (DANIELSSON, 158) pour avancer cette hypothèse. DANIELSSON a étudié les effets de la fistulisation biliaire des rats sur le métabolisme du cholestérol. On sait, depuis les travaux d'ERIKSSON (130-132) que la fistulisation biliaire provoque, chez le rat, une inversion du rapport chénodésoxycholique/cholique dans la bile, c'est à dire (parag. 4.2, p. 138) une accélération considérable du catabolisme hépatique du cholestérol. DANIELSSON observe que la fistulisation multiplie par 18 la vitesse d'incorporation de l'acétate -  $^{14}\text{C}$  dans le cholestérol hépatique et, par 8, l'hydroxylation en  $7\alpha$  du cholestérol par les fractions soluble et microsomale du foie, les autres étapes de la formation des acides biliaires ne paraissant pas influencées. On peut donc envisager, avec réserves, une régulation du métabolisme hépatique du cholestérol par le contrôle de l'hydroxylation en  $7\alpha$  ou des conditions de cette hydroxylation. Ce pourrait être un des sites d'action de l'exercice.

On pourrait, évidemment, émettre de nombreuses autres hypothèses mais, faute de données concrètes, de façon purement gratuite si ne semblait s'ouvrir une voie nouvelle d'information : l'étude des mécanismes d'intervention des hormones thyroïdiennes dans le métabolisme du cholestérol.

Plusieurs auteurs (35-39-40) ont en effet suggéré la possibilité d'une médiation de ces hormones dans l'action du travail sur le métabolisme du cholestérol. Les relations que nous avons trouvées entre l'exercice et la composition de la bile, nous permettent de renchérir en fournissant un argument de poids à l'appui de cette hypothèse dont le fondement est double : d'une part, il existe une remarquable concordance des effets de l'exercice et de l'hyperthyroïdisme sur le métabolisme du cholestérol; d'autre part, la fonction thyroïdienne est influencée par l'exercice.

VAN BELLE et DANIELSSON ont donné d'excellentes analyses, que de récentes publications ont complétées (99 - 101 - 134 - 159 à 163), des nombreux travaux concernant l'influence des hormones thyroïdiennes sur ce métabolisme : essentiellement, l'état hyperthyroïdien, naturel ou provoqué, conduit à une baisse du glycogène hépatique et du taux de cholestérol sérique, à une augmentation de la synthèse hépatique du cholestérol, de la sécrétion biliaire de cholestérol et de l'excrétion fécale de stérols, enfin à un accroissement de l'importance relative de l'acide chénodésoxycholique dans la bile. Avec l'état hypothyroïdien, on observe inversement, une élévation du taux de cholestérol sérique et une baisse de la proportion de l'acide chénodésoxycholique dans la bile accompagnant une diminution de la masse globale d'acides biliaires. Il suffit de rapprocher ces faits de ceux que nous avons présentés ou discutés, pour percevoir entre les effets de l'exercice et ceux des hormones thyroïdiennes, un parallélisme digne d'attention.

Cette concordance ne semble pas être une simple coïncidence puisque l'exercice provoque une exaltation de la fonction thyroïdienne et des modifications de la thyroïde : hypertrophie de la thyroïde (164) où le taux d'acétylcholine liée augmente (165 - 167) et baisse importante du stock thyroïdien d'iode observée à l'aide de  $^{131}\text{I}$  (168 - 169).

L'hypothèse d'une intervention de la fonction thyroïdienne paraît donc suffisamment fondée pour devenir une hypothèse de travail. Il n'est pas justifié pour autant d'assimiler la recherche sur les mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes à une recherche sur ceux de l'exercice ; mais il devient possible de chercher dans la première, des orientations pour la seconde.

Parmi les sites possibles d'intervention des hormones thyroïdiennes, un des plus étudiés actuellement est le métabolisme oxydatif de la cellule en général ou des mitochondries en particulier (170 à 173) : il est accru par la thyroxine ; on peut noter, à ce propos, que les mitochondries du foie semblent être le siège exclusif de l'oxydation de la chaîne latérale du cholestérol lors de la formation des acides biliaires ou, pour le moins, de l'acide chénodésoxycholique (174) ; et MITROPOULOS a obtenu, à partir de cholestérol -  $4 - ^{14}\text{C}$ , la production, par des mitochondries de foie, d'acide chénodésoxycholique ou d'acides de la même lignée, à l'exclusion de l'acide cholique (175).

La 3 hydroxy-3 méthyl-glutaryl réductase ( EC : 1.1.1.34) formatrice d'acide mévalonique au cours de la cholestérogénèse, voit également son activité fortement accrue par des injections de D.L. Thyroxine (176). Sur cet enzyme, selon SIPERSTEIN (177 à 180), est centré le système de régulation de la cholestérogénèse hépatique.

De ce point rapide sur la recherche consacrée à l'action des hormones thyroïdiennes, se dégage une certitude : la connaissance des relations entre exercice et métabolisme du cholestérol ferait d'importants progrès si l'on apportait la preuve d'une intervention de la thyroïde dans ces relations.



## C O N C L U S I O N S

- 1 - La pratique régulière de la marche provoque, chez le rat Wistar mâle adulte, une activation du métabolisme hépatique du cholestérol : la cholestérogénèse, la production d'acides biliaires et l'excrétion biliaire du cholestérol sont accrues.
- 2 - Cette activation du métabolisme n'entraîne, chez le rat normalement nourri, aucune modification des réserves de cholestérol hépatique total ni du taux de cholestérol sérique total; elle s'exprime, en particulier, par une importance accrue de l'ensemble métabolique à renouvellement rapide, de l'acide chénodésoxycholique, au détriment de l'ensemble métabolique à renouvellement plus lent, de l'acide cholique.
- 3 - Ces faits confirment l'hypothèse d'une intervention des hormones thyroïdiennes dans le mécanisme d'action de l'exercice sur le métabolisme du cholestérol.



B I B L I O G R A P H I E

- 1 GOPALAN C. et RAMANATHAN K.S. - Indian J. Med. Res. 1957  
45 - p. 593
- 2 KARVONEN M.J., RAUTANEN Y., RIKKONEN P. et KIHLEBERG J.  
Ann. Med. Internae Fenniae 1958, - 47 - p. 75
- 3 MELONI C., ROMAGNOLI G. et ZANARDI A. - Giorn. Gerontol.  
1961 - 9 - p. 975
- 4 ROMANOVA L.S. et BABARIN P.M. - Kardiologiya 1961 - 6 -  
p. 36
- 5 BABARIN P.M., ROMANOVA L.S. et CHIBICHYAN D.A. -  
Metody. Issled. v Sportivn. med / Sb 1964 - p. 269
- 6 TAYLOR H.L., ANDERSON J.T. et KEYS A. - Proc. Soc. Exptl.  
Biol. Med. 1957 - 95 - p. 383
- 7 LUMIA V. et GIARNIERI D. - Giorn. Gerontol. 1960 - 8 - p. 615
- 8 KOBERNICK S.D. et NIWAYAMA G. - Am. J. Pathol. 1959 - 35 -  
p. 675
- 9 KOBERNICK S.D. et NIWAYAMA G. - Am. J. Pathol. 1960 - 36 -  
p. 393
- 10 MAYER J., ZOMZELY C. et STARE F.J. - Experientia 1957 -  
13 - p. 250
- 11 BARSZCZ D. et MARKIEWICZ L. - Acta Physiol. Polon. 1958 -  
9 - 727

- 12 KOESSLER A., WOLLENBERGER A. et HALLE W. - Acta Biol. et Med. Ger. 1961 - 7 - p. 172
- 13 MARABINI B., BORGHI A. et BIGOZZI U. - Riv. Crit. Clin. Med. 1953 - 53 - p. 367
- 14 MNUKHINA E.S. - Fiziol. Zhur. 1955 - 41 - p. 89
- 15 MONTOYE H.J., VAN HUSS W.D., BREWER W.D., JONES E.M., OHLSON M.A., MAHONEY E. et OLSON H. - Am. J. Clin. Nutr. 1959 - 7 - p. 139
- 16 PELTONEN L. et KARVONEN M.J. - Ann. Med. Eptl. et Biol. Fenniae 1956 - 34 - p. 246
- 17 POPOVA N.K. - Ukr. Biokhim. Zhur. 1960 - 32 - p. 225
- 18 KRITCHEVSKY D. - Cholesterol - John Wiley and Sons, 1958
- 19 BOURNE G.H. - Structure and function of Muscle, vol. 2, Acad. Press, 1960
- 20 KAMEN M.D. - Isotopic tracers in Biology, P. 198 - Acad. Press, 1957
- 21 POPJAK G. et CORNFORTH J.W. - Adv. in Enzymology, 1960 - 22 - p. 281
- 22 TCHEN T.T. dans "Metabolic pathways" de GREENBERG D.M., vol. 1, p. 389 - Acad. Press, 1961
- 23 SIPERSTEIN M.D. et FAGAN V.M. - Science, 1957 - 126 - p. 1012
- 24 PREISLER E. et PANKOWSKA U. - Bull. Soc. Amis Sci. Lettres Poznan 1962 C 12 - 61 - publié 1963
- 25 CARLSON L.A. et MOSSFELDT F. - Acta Physiol. Scand. 1964 - 62 - p. 51

- 26 HOLLOSZY J.O., SKINNER J.S., TORO G. et CURETON T.K. - Am. J. Cardiol. 1964 - 14 - P. 753
- 27 WILCOX E.B., GALLOWAY L.S. et TAYLOR F. - J. Am. Dietet. Assoc. 1964, - 44 - p. 95
- 28 BRECHTER C.L. et FORSBY N.H. - Z. Ernährungswiss. 1962 - 3 - p. 95
- 29 DUBOFF G.S. et STEVENSON W.W. - Clin. Chem. 1962 - 8 - p. 105
- 30 CAMPBELL D.E. - J. Lipid Res. 1965 - 6 - p. 478
- 31 FITZGERALD O., HEFFERMAN A. et McFARLANE R. - Clin. Sci. 1965 - 28 - p. 83
- 32 GSELL D. et MAYER J. - Am. J. Clin. Nutr. 1962 - 10 - p. 471
- 33 MASEK J., KRIKALA L. et OSANCOVA R. - Casopis lekaru Geskych, 1963, - 102 - p. 198
- 34 STULB S.C., McDONOUGH J.R., GREENBERG B.G. et HAMES C.G. - Am. J. Clin. Nutr. 1965 - 16 - p. 238
- 35 ALEKSANDROW D., KLOPOTOWSKI T. et SMIETANSKA Z. - J. Atherosclerosis Res. 1964 - 4 - p. 351
- 36 POPOVA N.K. - Ukr. Biokhim. Zhur 1962 - 34 - p. 270
- 37 GOLLNICK P.D. et SIMMONS S.W. - Intern. Z. Angew. Physiol. 1967 - 23 - p. 322
- 38 HEBBELINCK M. et CASIER H. - Intern. Z. Angew. Physiol. 1966 - 22 - p. 185
- 39 GOLLNICK P.D. - Am. J. Physiol. 1963 - 205 - p. 453
- 40 JONES E.M., MONTOYE H.J., JOHNSON P.B., MARTIN M.J.M., VAN HUSS W.D. et CEDERQUIST D. - Am. J. Physiol 1964 - 207 - p. 460

- 41 SIMKO V. et BABALA J. - Giorn. Arteriosclerosi, 1966 - 4 -  
p. 96
- 42 DUPERRAY B. et PACHECO H. - C.R. Acad. Sci. 1963 - 257 -  
p. 2549
- 43 DUPERRAY B., VILLE A. et PACHECO H. - C.R. Acad. Sci.  
1965 - 261 - p. 2397
- 44 DUPERRAY B. et PACHECO H. - C.R. Acad. Sci. 1966 - 263 -  
p. 1887
- 45 CHEVALLIER F. et LUTTON C. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1966 -  
48 - p. 295
- 46 BOYD G. S. dans "The control of Lipid metabolism, Biochem.  
Soc. Symp. n° 24, Oxford, 1963 - p. 79
- 47 LUPIEN P. J. et MIGICOVSKY B. B. - Can. J. Biochem. 1964 -  
42 - p. 443
- 48 HORST A. , ROZYNKOWA D. et ZAGORSKA I. Acta Med. Polona  
1960 - 1 - p. 11
- 49 HODGES J. H. , JONES M. T. et STOCKHAM M. A. - Nature, 1962  
- 193 - p. 1187
- 50 RASKEV M. , RADEVA S. , ANGAROV C. et NIKOLOVA N. -  
Nauch. Tr. Visshiya Med Inst. Sofia, 1962 - 41 - p. 15
- 51 GRUNDY S. M. et GRIFFIN A. C. - Circulation, 1959 - 19 -  
p. 496
- 52 SHANNON I. R. , DAVIS W. V. , SZMYD L. et PRIGMORE J. R. -  
U. S. Dept. Com. Off. Tech. Serv. A. D. 403.651, 1963
- 53 KRATZING C. C. - Am. J. Physiol. 1965 - 209 - p. 781
- 54 SAKAMOTO H. - Intern. Congr. Occupational Health, 14 th,  
Madrid, 1963, publ. 1964 - p. 764

- 55 ZWINGELSTEIN (G.) Thèse de Doctorat de l'Université de Lyon, 1960, n° 167
- 56 BLOOR W.R. - J. Biol. Chem. 1916 - 24 - p. 227
- 57 BOYD E.M. - J. Biol. Chem. 1936 - 115 - p. 37
- 58 KRIEGER L. et KRIEGER Mme - Ann. Biol. Clin. 1945 - 6 - p. 141
- 59 ASSOUS E.F. et GIRARD M.L. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1962 -11 - p. 1021
- 60 BLOOR W.R. et KNUDSON A. - J. Biol. Chem. 1916 - 27 - p. 107
- 61 MACHEBOEUF M. et DELSAL J.L. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1942 - 24 - p. 296
- 62 LIEBERMANN C. - Ber. 1885 - 18 - p. 1803
- 63 BURCHARD H. - Chem. Zentr. 1890 - 1 - p. 25
- 64 DELSAL J.L. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1944 -26 - p. 99
- 65 ZLATKIS A., ZAK B. et BOYLE A.J. - J. Lab. Clin. med. 1953 41 - p. 485
- 66 BRUN G. - Techniques de Laboratoire, Masson et Cie 1954
- 67 LAMOTTE M. - Initiation aux méthodes statistiques en Biologie, Masson et Cie, 1962
- 68 ROHR D., SAINT-SAËNS M. et MONOD H. - J. Physiol. Paris 1966 - 58 - p. 5
- 69 LOEHR G.W. et WALLER H.D. dans "Methods of Enzymatic Analysis, de BERGMAYER H.U., p. 744 - Acad. Press, 1963

- 70 SCHMIDT E. et WILDHIRT E. - Klin. Wochenschr. 1958 - 36 - p. 171
- 71 SCHMIDT E. et SCHMIDT F.W. - Klin. Wochenschr. 1960 - 38 - p. 957
- 72 FRANTZ I.D. Jr et BUCHER N.L.R. - J. Biol. Chem. 1954 - 206 - p. 471
- 73 BLOCH K., BOREK E. et RITTENBERG D. - J. Biol. Chem. 1946 - 162 - p. 441
- 74 JATZKEVITZ H. et MEHL E. - Hoppe Seyler's Z. - Physiol. Chem. 1960 - 320 - p. 251
- 75 ZOELLNER N. et WOLFAM G. - Klin. Wochenschr. 1962 - 40 - p. 1101
- 76 BENNETT R.D. et HEFTMANN E. - J. Chromatog. 1962 - 9 - p. 359
- 77 WALDI D. dans "Dünnschicht Chromatographie" de STAHL E., p. 260 - Springer Verlag, Berlin 1962
- 78 BARBIER M., JAGER H., TOBIAS H. et WYSS E. - Helv. Chim. Acta, 1959 - 42 - p. 2440
- 79 MATTHEWS J.S., PEREDA V.A.L. et AGUILERA P.A. - J. Chromatog. 1962 - 9 - p. 331
- 80 CHEVALLIER F. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1961 - 43 - p. 443
- 81 ECKLES N.F., TAYLOR C.B., CAMPBELL D.J., GOULD R.G., KEEGAN P., KELLY F.B. Jr, DAVIS C.B. Jr et LATENSER J. - J. Lab. Clin. Med. 1955 - 46 - p. 359
- 82 TAKEUCHI N., IRTANI N., WELLS W.W. et WESTERMANN M.P. - Biochem. Biophys. Acta, 1966 - 125 - p. 375
- 83 CHEVALLIER F. - Arch. Sci. Physiol. 1956 - 10 - p. 321

- 84 GOULD R.G. , LEROY G.V. , OKITA G.T. , KABARA J.J. ,  
KEEGAN P. et BERGENSTAL P.M. - J. Lab. Clin. Med. 1955 -  
46 - p. 372.
- 85 MARQUETTE M.M. et SCHWEIGERT B.S. - Proc. Soc. Exptl.  
Biol. Med. 1950 - 74 - p. 860
- 86 STERN R. et BIRD L.H. - Biochem. J. 1949 - 44 - p. 635
- 87 KALINA M. et GAHAN P.B. - Histochemie, 1965 - 5 - p.430
- 88 WEBER G. , BANERJEE G. et ASHMORE J. - Biophys. Biochem.  
Res. Commun. 1960 - 3 - p. 182
- 89 RALL T.W. et LEHNINGER A.L. - J. Biol. Chem. 1952 - 194  
p. 119
- 90 NARAHARA H. T. et OZAND P. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.  
1960 - 103 - p. 529
- 91 STEINER D. et WILLIAMS R.H. - J. Biol. Chem. 1959 - 234  
p. 1342
- 92 HIRANO Y. - Orient. J. Diseases Infants, 1934 - 16 - p. 25 et  
Ber. Ges. Physiol. Exptl. Pharmakol. 1934 - 86 - p. 82
- 93 KURUMIYA S. - Sei-i-kai med. 1, 1938 - 57 - p.2 et Chem.  
Zentr. 1940 II - p. 2045
- 94 OGAWA M. - J. Agr. Chem. Soc. Japan, 1941 - 17 - p.255  
et Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 1941 - 17 - p.26
- 95 LECOQ R. - Manuel d'Analyses médicales et de Biologie  
Clinique, Doin et Cie, 1962.
- 96 STONE S.H. - Science, 1954 - 119 - p. 100
- 97 SCHWEIZER O. , HOWLAND W.S. , SULLIVAN C. et VERTES E. -  
Anesthesiology, 1967 - 28 - p. 814

- 98 RUDNEV M. I. - Klinich. Khirurgiya 1966 - 2 - p. 60
- 99 VAN BELIËH. - Cholesterol, Bile acids and Atherosclerosis, North Holland Publ. Cie, 1965
- 100 DANIELSSON H. - Acta Chem. Scand. 1960 - 14 - p. 846
- 101 DANIELSSON H. - Adv. in Lipid Res. 1963 - 1 - p. 335
- 102 VANLERENBERGHE J. , BIZARD-GREGOIRE N. , ROBELET A. et GUERRIN F. - Anesthésie, Analgésie, Réanimation - 1958 - 15 - p. 901
- 103 LAMBIOTTE M. - Influence de la nature des lipides alimentaires sur le métabolisme du cholestérol chez le rat adulte - Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Paris 1963, série A, n° 4113, n° d'ordre 4964
- 104 ANTHONY W. L. et SAKER W. T. - J. Chromatog. 1964 - 13 - p. 567
- 105 ISAKSSON B. - Acta Chem. Scand. 1954 - 8 - p. 889
- 106 SJÖVALL J. - Acta Chem. Scand. 1962 - 16 - p. 1761
- 107 SJÖVALL J. - Biochem. J. 1965 - 96 - p. 188
- 108 KUKSIS A. - J. Am. Oil Chem. Soc. 1965 - 42 - p. 257
- 109 SCHLENK H. et GELLERMANN J. L. - Anal. Chem. 1960 - 32 - p. 1412
- 110 DE BOER T. J. et BACKER H. S. - Rec. Trav. Chim. 1954 - 73 - p. 229
- 111 VOGEL A. I. - A. textbook of practical organic chemistry, 3e édition, Longmans 1959
- 112 SWEELEY C. C. et CHANG T. - Anal. Chem. 1961 - 33 - p. 1860

- 113 FROSCH B. et WAGENER H. - Klin. Wochenschr. 1964 - 42 - p. 192
- 114 CHEVALLIER F. et BRANCO J.R. - Rev. Fr. d'études clin. et biol. 1963 - 9 - p. 903
- 115 SWELL L. et LAW M.D. - Arch. Biochem. Biophys. 1966 - 113 - p. 143
- 116 NESTEL P.J. et COUZENS E.A. - J. Clin. Invest. 1966 - 45 - p. 123
- 117 GOODMAN (de WITT) S. et SHIRATORI T. - J. Lipid Res. 1964 - 5 - p. 578
- 118 BOYD G.S. - Fed. Proc. 1962 - 21 - p. 86
- 119 SWELL L., LAW M.D. et TREADWELL C.R. - Arch. Biochem. Biophys. 1964 - 105 - p. 541.
- 120 CACCIA PERUGINI I., DELEO T., FOTI L. et ORRU A. - Ric. Sci. Rend. Sez. B, 1964 - 4 - p. 551
- 121 AFTERGOOD L., DEUEL H.J. Jr et ALFIN-SLATER R.B. - J. Nutrition, 1957 - 62 - p. 129
- 122 NORMAN A. et SHORB M.S. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1962 - 110 - p. 552
- 123 NORMAN A. - Kgl. Fysiograf. Sallskap. Lund Förh. 1955 - 25 - p. 19
- 124 NORMAN A. et SJÖVALL J. - J. Biol. Chem. 1958 - 230 - p. 872
- 125 NORMAN A. et SJÖVALL J. Acta Chem. Scand. 1960 - 14 - p. 1295
- 126 MAKITA M. et WELLS W.W. - Anal. Biochem. 1963 - 5 - p. 523

- 127 BERGSTRÖM S., ROTTENBERG M. et SJÖVALL J. - Z. Physiol. Chem. 1953 - 295 - p. 278
- 128 PORTMANN O. W. - Arch. Biochem. Biophys. 1958 - 78 - p. 125
- 129 NORMAN A. et SAMUELSSON B. - Acta Physiol. Scand. 1959 - 45 - 300
- 130 ERIKSSON S. - Acta Chem. Scand. 1956 - 10 - p. 156
- 131 ERIKSSON S. - Acta Chem. Scand. 1956 - 10 - p. 1055
- 132 ERIKSSON S. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1957 - 94 - p. 582
- 133 CHEVALLIER F. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1960 - 42 - p. 643
- 134 BEHER W. T., BEHER M. E. et SEMENUK G. - Metab. Clin. Exptl. 1966 - 15 - p. 181
- 135 CRONHOLM T. et SJÖVALL J. - Eur. J. Biochem. 1957 - 2 - p. 375
- 136 BEHER W. T., BEHER M. E. et RAO B. - Life Sci. Oxford, 1967 - 6 - p. 863
- 137 BEHER W. T., RAO B., BEHER M. E. et BERTASIUS J. - Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1967 - 124 - p. 1193
- 138 BEHER W. T., RAO B., BEHER M. E., SEMENUK G., BERTASIUS J. et VULPETTI N. - Henry Ford. Hosp. Med. J. 1967 - 15 - p. 107
- 139 CHEVALLIER F. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1966 - 48 - p. 715
- 140 FAVARGER P. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1958 - 40 - p. 1025
- 141 CHEVALLIER F. - Biochim. Biophys. Acta, 1964 - 84 - p. 316

- 142 CHEVALLIER F. et MATHE D. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1964  
- 46 - p. 509
- 143 CHEVALLIER F. et LUTTON C. - Bull. Soc. Chim. Biol.  
1966 - 48 - p. 507
- 144 VECSEI P. et CSALAY L. - Z. Vitamin, Hormon, Ferment  
Forsch. 1965 - 14 - p. 57
- 145 MONTROYE H.J., SHERBURNE J., ACKERMAN K., JONES E.  
et CEDERQUIST D. - Res. Quart. 1962 - 33 - p. 430
- 146 WONG H.Y.C., ANDERSON M.B., KIM J.K. LIU D.J. et  
HAWTHORNE E.K. - Fed. Proc. 1960 - 19 - p. 13
- 147 ERANKO O., KARVONEN M.J. et RAISANEN L. - Acta Endocri-  
nol. 1962 - 39 - p. 285
- 148 NAZAR K. - Acta Physiol. Polon. 1965 - 16 - p. 195
- 149 YOUNG D.R., PRICE R., ELDER N.E. et ADACHI R.R. -  
J. Appl. Physiol. 1962 - 17 - p. 669
- 150 VALENTIN H., LEHNERT G., MUECKE W. et DEUTSMANN H.  
Muench. Med. Wochenschr. 1965 - 107 - p. 1334
- 151 ROMANOWSKI W., MISSIURO W., LUBANSKA-TOMASZEWSKA  
L. et JANOTA-LUKASZEWSKA J. - Fiziol Zh. S.S.S. R. 1966 -  
52 - p. 415
- 152 CHEVALLIER F. - Arch. Sci. Physiol. 1956 - 10 - p. 249
- 153 BLOOM B., EISENBERG F. Jr. et STETTEN D. Jr - J. Biol.  
Chem. 1955 - 215 - p. 461
- 154 MARTELLI P. et GRASSELLINI A. - Boll. Soc. Ital. Biol.  
Sper. 1961 - 37 - p. 689
- 155 WEBER G. - Fructose-1, 6-diphosphatase, Its role gluconéogé-  
nesis Symposium, Univ. Virginia, 1961 - p. 57

- 156 HIRSCHBERG E. , SNIDER D. et OSNOS M. - Adv. Enzyme Regulation, 1964 - 2 - p. 301
- 157 STIELAU W. J., FRIELAND R. A. et MEYER J. H. - J. Nutr. 1965 - 87 - p. 107
- 158 DANIELSSON H. , EINARSSON K. et JOHANSSON G. - Eur. J. Biochem. 1967 - 2 - p. 44
- 159 ABDURAKMANOV P. A. - Probl. Endocrinol. i Gormono Terap. 1965 - 11 (4) - p. 6
- 160 O'HARA D. D. , PORTE D. Jr et WILLIAMS R. H. - Metab. Clin. Exptl. 1966 - 15 - p. 123
- 161 KRITCHEVSKY D. et TEPPER S. A. - Med. Pharmacol. Expts. 1966 - 14 - p. 1
- 162 MYANT N. B. et ILIFFE J. dans "The control of Lipid metabolism, Biochem. Soc. Symposium n° 24, Oxford 1963 - p. 145
- 163 TSYNG CH'IN HSIA et SHIH CHEN WANG - Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng WU WU Li Hsueh Pao 1965 - 5 - p. 646
- 164 ORMA E. J. - Acta Physiol. Scand. 1957 - 41, suppl. 142 - p. 1
- 165 STERESCU N. , ROSNER B. et STANCU A. - Acad. Rep. Pop. Romine Studii Cercetari Fisiol. 1961 - 6 - p. 505
- 166 STERESCU N. , COVASNEANU Z. et STANCU A. Acad. Rep. Pop. Romine Studii Cercetari Fiziol. 1960 - 5 - p. 615
- 167 ROSNER B. et STERESCU N. - Acad. Rep. Pop. Romine Studii Cercetari Fiziol. 1960 - 5 - p. 515
- 168 KIPSZIDZE N. N. - Bull. Exptl. Biol. Med. URSS 1958 - 46 - p. 32

- 169 STERESCU N., COVASNEANU Z., GABRIELESCU E., STANCU A.  
et BORDERANU A. - Acad. Rep. Pop. Romine Studii  
Cercetari Fiziol. 1962 - 7 - p. 107
- 170 BOYD G. S. dans "The control of Lipid Metabolism", Biochem.  
Soc. Symp. n°24, Oxford, 1963 - p. 79
- 171 ROCHE J., MICHEL R. et HUET P. - C.R. Soc. Biol. 1965  
159 - p. 1891 et p. 1935
- 173 HOCH F. L. - Proc. Intern. Thyroid Conf. 5 th. Rome 1965  
- p. 316.
- 174 BJORKHEM I., DANIELSSON H. et EINARSONN K. - Eur. J.  
Biochem. 1967 - 2 - p. 294
- 175 MITROPOULOS K. A. et MYANT N. B. - Biochem J. 1966 - 99 -  
p. 518
- 176 GRIES F. A., MATSCHINSKY F. et WIELAND O. - Symp. Duet.  
Ges. Endocrinol. 1963 - 9 - p. 149
- 177 SIPERSTEIN M. D. - Am. J. Clin. Nutr. 1960 - 8 - p. 645
- 178 SIPERSTEIN M. D. - et GUEST M. J. - J. Clin. Invest. 1960  
- 39 - p. 642
- 179 SIPERSTEIN M. D. et FAGAN V. M. - Adv. Enzyme Regulation  
1964 - 2 - p. 249
- 180 SIPERSTEIN M. D. et FAGAN V. M. - J. Biol. Chem. 1966  
241 - p. 602

## TABLE DES MATIERES

---

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION GENERALE .....                                                                                                                                                                               | 1  |
| SOMMAIRE .....                                                                                                                                                                                            | 6  |
| CHAPITRE PREMIER - Influence de la marche sur le poids<br>du foie, des glandes surrénales et<br>des testicules, sur la cholestérolé-<br>mie et sur le taux et la masse totale<br>de cholestérol hépatique |    |
| 1 - Introduction .....                                                                                                                                                                                    | 13 |
| 2 - Matériel biologique et Techniques                                                                                                                                                                     |    |
| 2.1. - Matériel biologique                                                                                                                                                                                |    |
| 2.1.1. - Conditions d'élevage .....                                                                                                                                                                       | 14 |
| 2.1.2. - Poids des animaux .....                                                                                                                                                                          | 14 |
| 2.1.3. - Sacrifice. Prélèvement des tissus                                                                                                                                                                | 15 |
| 2.1.4. - Régime alimentaire .....                                                                                                                                                                         | 15 |
| 2.1.5. - Exercice                                                                                                                                                                                         |    |
| 2.1.5.1. - Premier type de travail<br>imposé aux rats : la<br>nage. Motifs de l'abandon<br>de ce mode d'exercice                                                                                          | 16 |
| 2.1.5.1. - Mode d'exercice retenu :<br>la marche .....                                                                                                                                                    | 17 |
| 2.2. - Techniques                                                                                                                                                                                         |    |

|       |                                                                                                        |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1 | - Pesées .....                                                                                         | 18 |
| 2.2.2 | - Technique d'extraction du cholestérol<br>hépatique .....                                             | 18 |
| 2.2.3 | - Technique d'extraction du cholestérol<br>sérique total .....                                         | 20 |
| 2.2.4 | - Technique d'extraction du cholestérol<br>sérique estérifié .....                                     | 20 |
| 2.2.5 | - Technique de dosage du cholestérol ..                                                                | 21 |
| 2.2.6 | - Contrôle de validité des techniques<br>d'extraction et de dosage du chole-<br>stérol hépatique ..... | 22 |
| 2.2.7 | - Contrôle de validité des techniques<br>d'extraction et de dosage du chole-<br>stérol sérique .....   | 23 |
| 2.2.8 | - Traitement statistique des résultats                                                                 | 24 |

### 3 - Résultats

|     |                                                                                                                                      |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | - Influence de la marche sur le taux de croissance..                                                                                 | 25 |
| 3.2 | - Influence de la marche sur le poids des organes<br>(testicules, surrénales, foie).....                                             | 25 |
| 3.3 | - Influence de la marche sur le taux de cholestérol<br>hépatique et sur la masse totale de cholestérol<br>hépatique .....            | 26 |
| 3.4 | - Influence de la marche sur le taux de cholestérol<br>sérique total et sur le taux d'estérification du<br>cholestérol sérique ..... | 27 |

Tableaux et Figures : voir page 167

|   |                                                                        |    |
|---|------------------------------------------------------------------------|----|
| 4 | - Discussion des résultats. Révision de l'hypothèse de<br>départ ..... | 44 |
|---|------------------------------------------------------------------------|----|

CHAPITRE SECOND - Influence de la marche sur l'incorpora-  
tion " in vitro " de l'acétate de  
sodium -1-  $^{14}\text{C}$  dans le cholestérol par  
des tranches de foie et sur la produc-  
tion " in vitro " de NADPH par une  
fraction d'homogénat de foie .....

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 - Introduction .....                                                                                                                                                                    | 49 |
| 2 - Techniques                                                                                                                                                                            |    |
| 2.1. - Mesure de la vitesse d'incorporation de l'acétate<br>de sodium - 1 - $^{14}\text{C}$ dans le cholestérol par des<br>tranches de foie                                               |    |
| 2.1.1. - Incubation de tranches de foie en<br>présence d'acétate radioactif ...                                                                                                           | 51 |
| 2.1.2. - Extraction, purification et déter-<br>mination de l'activité spécifique<br>du cholestérol - U - $^{14}\text{C}$ .....                                                            | 52 |
| 2.1.3. - Contrôle de la pureté du cholesté-<br>rol radioactif soumis aux comptages                                                                                                        | 54 |
| 2.1.4. - Contrôle de validité de l'ensemble<br>de la méthode .....                                                                                                                        | 66 |
| 2.1.5. - Critique de la méthode                                                                                                                                                           |    |
| 2.1.5.1. - Vitesse de pénétration<br>de l'acétate dans les<br>cellules hépatiques ...                                                                                                     | 67 |
| 2.1.5.2. - Défaut d'une mesure<br>directe de la quantité<br>de $^{14}\text{C}$ incorporée par<br>g. de tissu .....                                                                        | 68 |
| 2.1.5.3. - Interférence du sang<br>retenu par les tranches<br>de foie dans l'incorpo-<br>ration du $^{14}\text{C}$ et dans la<br>détermination et l'activité<br>spécifique du cholestérol | 70 |
| 2.2. - Mesure de l'activité de la Glucose-6-phosphate<br>Deshydrogénase (EC : 1.1.1.49) du foie .....                                                                                     | 70 |
| 2.2.1. - Protocole opératoire .....                                                                                                                                                       | 70 |
| 2.2.2. - Contrôle de reproductibilité .....                                                                                                                                               | 71 |
| 2.2.3. - Critique de la méthode                                                                                                                                                           |    |
| 2.2.3.1. - Extraction de l'enzyme<br>par broyage et centrifu-<br>gation .....                                                                                                             | 72 |

|         |                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.3.2 | - Interférence de la<br>6-Phospho-Gluconique<br>Deshydrogénase<br>(E. C: 1.1.1.44).....                                                                                                                                                            | 72 |
| 2.2.3.3 | - Interférence des oxydo-<br>réductases acceptant<br>NADPH comme donneur<br>d'hydrogène .....                                                                                                                                                      | 73 |
| 2.2.3.4 | - Intervention du sang re-<br>tenu par le foie analysé                                                                                                                                                                                             | 74 |
| 2.3     | - Détermination de l'activité de la Glucose -<br>6 - Phosphate Deshydrogénase des erythrocytes<br>de sang veineux. Estimation du volume du sang<br>retenu par le foie d'un rat décapité ( par compa-<br>raison des taux de fer du sang et du foie) |    |
| 2.3.1   | - Dosage du fer dans le sang et le foie..                                                                                                                                                                                                          | 74 |
| 2.3.2   | - Estimation approximative du volume<br>de sang retenu par le foie d'un rat<br>décapité .....                                                                                                                                                      | 75 |
| 2.3.3   | - Détermination de l'activité de la<br>Glucose -6- Phosphate Deshydrogénase<br>des erythrocytes de sang veineux ....                                                                                                                               | 75 |
| 3       | - Résultats                                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 3.1     | - Influence de la marche sur la vitesse d'incorpo-<br>ration de l'acétate de sodium -1- <sup>14</sup> C dans le<br>cholestérol par des tranches de foie de rat .....                                                                               | 79 |
| 3.2     | - Influence de la marche sur le taux de fer dans<br>le sang et le foie et sur la vitesse de formation<br>de NADPH par un extrait de foie, en présence<br>de Glucose -6- Phosphate et de NADP .....                                                 | 79 |
| 4       | - Discussion des résultats .....                                                                                                                                                                                                                   | 84 |

Tableaux et Figures : voir page 167

CHAPITRE TROISIEME - Influence de la marche sur la répartition pondérale du cholestérol et des acides biliaires dans la bile.

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1 - Introduction .....                                                                                                                                                     | 89  |
| 2 - Techniques                                                                                                                                                             |     |
| 2.1. - Prélèvement de bile .....                                                                                                                                           | 91  |
| 2.2. - Extraction, purification et dosage colorimétrique du cholestérol, de l'acide chénodésoxycholique et de l'acide cholique                                             |     |
| 2.2.1. - Extraction et dosage du cholestérol ...                                                                                                                           | 92  |
| 2.2.2. - Extraction et purification des acides biliaires .....                                                                                                             | 92  |
| 2.2.3. - Dosage de l'acide chénodésoxycholique .....                                                                                                                       | 93  |
| 2.2.4. - Dosage de l'acide cholique .....                                                                                                                                  | 94  |
| 2.2.5. - Contrôle de reproductibilité et de rendement .....                                                                                                                | 94  |
| 2.2.6. - Critique de la méthode .....                                                                                                                                      | 95  |
| 2.3. - Chromatographie en phase gazeuse des acides biliaires et du cholestérol de la bile .....                                                                            | 95  |
| 2.3.1. - Extraction et préparation des substances à analyser .....                                                                                                         | 95  |
| 2.3.2. - Technique chromatographique ....                                                                                                                                  | 97  |
| 2.3.3. - Reproductibilité et rendement ....                                                                                                                                | 98  |
| 2.4. - Détermination de l'activité spécifique des acides cholique et chénodésoxycholique de la bile recueillie après une injection intraportale d'acétate radioactif ..... | 104 |
| 2.4.1. - Protocole opératoire .....                                                                                                                                        | 104 |
| 2.4.2. - Précision des résultats .....                                                                                                                                     | 105 |
| 2.4.3. - Contrôle de pureté des acides soumis aux comptages de radioactivité .....                                                                                         | 106 |

|       |   |                                                                               |     |
|-------|---|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.4.4 | - | Expérience complémentaire : technique modifiée d'injection de l'acétate ..... | 106 |
| 2.4.5 | - | Poids des rats .....                                                          | 107 |

### 3 - Résultats

|     |   |                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-----|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1 | - | Influence de la marche sur le débit de la bile .....                                                                                                                                                                | 109 |
| 3.2 | - | Influence de la marche sur les masses d'acides Cholique, Désoxycholique, Chénodésoxycholique, Hyodésoxycholique et cétolithocholique et sur la masse de cholestérol débitées en 2 h. par un catheter biliaire ..... | 109 |
| 3.3 | - | Influence de la marche sur la composition de la bile .....                                                                                                                                                          | 110 |
| 3.4 | - | Influence du jeûne sur la composition de la bile ..                                                                                                                                                                 | 110 |
| 3.5 | - | Activité spécifique et activité totale des acides cholique et chénodésoxycholique et du cholestérol débités en 2 h. par le canal cholédoque après une injection intraportale d'acétate radioactif .....             | 111 |

Tableaux et Figures : voir page 167

|     |   |                                                                                                                                                                 |     |
|-----|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4   | - | Discussion des résultats des séries 16 et 16 bis (marquage d'acides biliaires par injection d'acétate radioactif)                                               | 128 |
| 4.1 | - | Première interprétation : formation de l'acide chénodésoxycholique à partir de cholestérol libre et de l'acide cholique à partir de cholestérol estérifié ..... | 128 |
| 4.2 | - | Seconde interprétation : formation d'acide chénodésoxycholique et d'acide cholique à partir d'esters de cholestéryle différents .....                           | 129 |
| 4.3 | - | Troisième interprétation : vitesses de formation différentes pour les deux acides .....                                                                         | 129 |
| 4.4 | - | Quatrième interprétation : dilution inégale des molécules nouvellement formées par les molécules inertes revenant de l'intestin .....                           | 130 |

|                           |                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <u>CHAPITRE QUATRIEME</u> | - Discussion et interprétation<br>générales .....                                                                                                                         | 131 |
| 1                         | - Accélération de la cholestérogénèse hépatique .....                                                                                                                     | 133 |
| 2                         | - Modification de la composition de la bile .....                                                                                                                         | 133 |
| 3                         | - Accélération du catabolisme hépatique .....                                                                                                                             | 133 |
| 4                         | - Cohérence de l'interprétation des résultats .....                                                                                                                       | 134 |
| 4.1.                      | - Existence de deux ensembles métaboliques<br>d'acides biliaires différant par leurs vitesses<br>de renouvellement .....                                                  | 134 |
| 4.2.                      | - Relations entre la vitesse de conversion du<br>cholestérol en acides biliaires et les dimen-<br>sions de l'ensemble métabolique de l'acide<br>chénodésoxycholique ..... | 137 |
| 5                         | - Accroissement de l'excrétion biliaire de cholestérol                                                                                                                    | 138 |
| 6                         | - Influence de l'exercice sur le métabolisme du chole-<br>stérol dans les glandes surrénales .....                                                                        | 139 |
| 7                         | - Influence de l'exercice sur le taux de cholestérol<br>sérique total et sur le degré d'estérification du<br>cholestérol sérique .....                                    | 139 |
| 8                         | - Localisation de l'action du travail sur le métabo-<br>lisme du cholestérol .....                                                                                        | 140 |
| <u>CONCLUSIONS</u>        | .....                                                                                                                                                                     | 145 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u>      | .....                                                                                                                                                                     | 147 |

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

---

1 - TABLEAUX

|                                                                                                                                                                                                | page    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tableau 1 - Influence de la marche sur la croissance des rats .....                                                                                                                            | 28 - 29 |
| Tableau 2 - Influence de la marche sur le poids des glandes surrénales .....                                                                                                                   | 32 - 33 |
| Tableau 3 - Influence de la marche sur le poids du foie                                                                                                                                        | 34 - 35 |
| Tableau 4 - Influence de la marche sur le taux de cholestérol hépatique total .....                                                                                                            | 36 - 37 |
| Tableau 5 - Influence de la marche sur la masse de cholestérol présente dans le foie .....                                                                                                     | 38 - 39 |
| Tableau 6 - Influence de la marche sur le taux de cholestérol sérique total .....                                                                                                              | 40 - 41 |
| Tableau 7 - Influence de la marche sur le taux d'esté-<br>rification du cholestérol sérique .....                                                                                              | 42 - 43 |
| Tableau 8 - Systèmes de développement employés en<br>chromatographie en couche mince pour la<br>purification du cholestérol hépatique<br>radioactif .....                                      | 56 - 57 |
| Tableau 9 - Rf de diverses substances dans les systèmes<br>de développement employés en chromato-<br>graphie en couche mince pour la purification<br>du cholestérol hépatique radioactif ..... | 58 - 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                | page    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Tableau 10 - Rf observés dans quelques systèmes de développement en chromatographie en couche mince pour les substances séparées par le système n° II .....                                                                    | 60      |
| Tableau 11 - Activité spécifique de cholestérol purifié, avant et après une chromatographie de contrôle .....                                                                                                                  | 61      |
| Tableau 12 - Activité spécifique du cholestérol purifié, avant et après recristallisation .....                                                                                                                                | 62      |
| Tableau 13 - Activité spécifique du cholestérol extrait de tranches de foie incubées avec de l'acétate radioactif .....                                                                                                        | 80-81   |
| Tableau 14 - Influence de la marche sur le taux de fer dans le foie, de fer et d'hémoglobine dans le sang, et sur la vitesse de formation de NADPH par un extrait de foie, en présence de Glucose-6-phosphate et de NADP ..... | 82-83   |
| Tableau 15 - Temps de rétention relatifs des acides biliaires et du cholestérol méthylés et trifluoracétylés, en chromatographie en phase gazeuse .....                                                                        | 100-101 |
| Tableau 16 - Activité spécifique des acides cholique et chénodésoxycholique radioactifs purifiés, avant et après recristallisation .....                                                                                       | 108     |
| Tableau 17 - Volume de bile débité en 2 h. par le canal cholédoque .....                                                                                                                                                       | 113     |
| Tableau 18 - Masses d'acides biliaires et de cholestérol débitées en 2 h. par le canal cholédoque ...                                                                                                                          | 114-115 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                  | page      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tableau 19 - Influence de la marche sur la répartition pondérale des acides cholique, désoxycholique, chénodésoxycholique et hyodésoxycholique dans la bile .....                                                                                                | 116 - 117 |
| Tableau 20 - Influence de la marche sur les proportions respectives des acides cholique et chénodésoxycholique dans la bile ....                                                                                                                                 | 118       |
| Tableau 21 - Influence de la marche sur le pourcentage d'acides de la famille métabolique du chénodésoxycholique dans la masse totale d'acides des deux familles du cholique et du chénodésoxycholique .....                                                     | 119       |
| Tableau 22 - Influence du jeûne sur la composition de la bile chez les rats non exercés .....                                                                                                                                                                    | 120 - 121 |
| Tableau 23 - Activité spécifique et activité totale du cholestérol et des acides cholique et chénodésoxycholique de la bile recueillie pendant 2 h. après une injection intraportale d'acétate radioactif                                                        | 122 - 123 |
| Tableau 24 - Activité spécifique et activité totale du cholestérol et des acides cholique et chénodésoxycholique de la bile recueillie pendant 2 h. après une injection dans la veine porte, par l'intermédiaire d'un catheter portal, d'acétate radioactif .... | 124 - 125 |

## 2 - FIGURES

|                                                                                                                       |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| Figure 1 A - Schéma simplifié des principales étapes de la biosynthèse du cholestérol .....                           | 7 |
| Figure 1 B - Formules développées des acides biliaires .....                                                          | 8 |
| Figure 1 D - Schéma simplifié de la conversion du cholestérol en acide cholique et en acide chénodésoxycholique ..... | 9 |

|                                                                                                                                                              | page     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Figure 2 - Courbe de croissance de rats exercés et<br>de rats non exercés .....                                                                              | 31       |
| Figures 3, 4, 5 - Chromatogrammes en couche mince<br>et enregistrement de la radioactivité de<br>chromatogrammes en couche mince<br>d'extraits de foie ..... | 63-64-65 |
| Figure 6 - Courbe de production de NADPH par un<br>extrait de foie, en fonction du temps ....                                                                | 76-77    |
| Figure 7 - Chromatogrammes (phase gazeuse) de<br>cholestérol et d'acides biliaires méthylés<br>et trifluoracétylés .....                                     | 102-103  |
| Figure 8 - Vitesse de conversion du cholestérol en<br>acides biliaires, en fonction de la propor-<br>tion d'acide chénodésoxycholique dans la<br>bile .....  | 126-127  |

DEUXIEME THESE

---

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

STRUCTURE DU CENTRE ACTIF DES ENZYMES

VU :

Les Membres du Jury

M. H. PACHECO

Melle D. GAUTHERON

M. L. CRONENBERGER

VU et APPROUVE :

Le Doyen de la Faculté  
des Sciences,

J. BRACONNIER

Vu et accordé le permis d'imprimer :

LYON, le 22 Mars 1968

Le Recteur,

Président du Conseil de l'Université,

P. LOUIS





